

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-500132

(43) 公表日 平成9年(1997)1月7日

(51) Int.Cl.⁹A 6 1 K 39/00
9/50

識別記号

庁内整理番号

9284-4C
7329-4C

F I

A 6 1 K 39/00
9/50G
N

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願平7-504650
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)7月11日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)1月11日
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/07749
 (87) 国際公開番号 WO95/02416
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)1月26日
 (31) 優先権主張番号 08/090, 841
 (32) 優先日 1993年7月12日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 08/147, 781
 (32) 優先日 1993年11月4日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ヲァイラス リサーチ インスティテュー
ト
アメリカ合衆国, 02138 マサチューセッ
ツ, ケンブリッジ, モウルトン ストリー
ト 61

(72) 発明者 アンドリアノフ, アレキサンダー, ケイ.
アメリカ合衆国, 02178 マサチューセッ
ツ, ベルモント, パイン ストリート
108

(74) 代理人 弁理士 丹羽 宏之

最終頁に続く

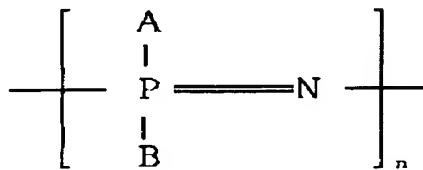
(54) 【発明の名称】 ヒドロゲルマイクロカプセル化ワクチン

(57) 【要約】

水溶性ポリマーあるいはポリマーヒドロゲルがワクチン形成のための抗原のカプセル化に使用される。抗原はポリマー溶液と混合され、極微粒子がポリマーおよび抗原から形成され、また、場合によってはポリマーは安定した極微粒子を形成するために任意に架橋される。望ましいポリマーはアルジネートおよびポリホスファゼン、更にその混合物である。経口デリバリのために、極微粒子は望ましくは15ミクロンもしくはそれ以下の直径のものであり、また胃腸管の粘膜内層に付着して細網内皮細胞による吸収を増加させる。

【特許請求の範囲】

1. 一つのワクチン組成物であって、免疫原性作用を誘発する抗原の有効量をカプセル化した生物適合性ポリマーよりなるヒドロゲル極微粒子を含み、この極微粒子は 200 ミクロンあるいはそれ以下の直径を持つワクチン組成物。
2. 請求の範囲第 1 項記載の組成物であって、ここで極微粒子が 1 ミクロンから 15 ミクロンまでの直径を持つことを特徴とする組成物。
3. 請求の範囲第 1 項記載の組成物であって、ここでポリマーがヒドロゲルを形成するために物理的架橋、共有結合架橋あるいはイオン架橋により架橋することが出来るポリマーおよびポリマーの塩よりなるグループから選択される生物適合性ポリマーであることを特徴とする組成物。
4. 請求の範囲第 3 項記載の組成物であって、ここでポリマーがアルジネート、ゼラチン、ペクチン、コラーゲン、ホスファゼン高分子電解質、ポリ（アクリルアミド）、ポリ（メタクリルアミド）、ポリ（酢酸ビニル）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、スルホン酸ポリスチレン、ポリアミン、ポリ（ビニルピリジン）、およびそのポリマーおよびモノマーの混合物およびコポリマーよりなるグループから選択されることを特徴とする組成物。
5. 請求の範囲第 3 項記載の組成物であって、ここでポリマーが式：



のホスファゼン高分子電解質であり、ここで A および B はポリマー内で独立して変化することが出来、それは、

- (i) 使用条件の下で加水分解を受けやすい基、もしくは
- (ii) 使用条件の下で加水分解を受け難い基であり、脂肪族、アリル、アラルキル、アルカリル、カルボン酸、ヘテロ芳香族、ヘテロアルキル、（脂肪族）アミノ

-、ヘテロアラルキル、ジ（脂肪族）アミノ-、アリルアミノ-、ジアリルアミノ-、アルキルアリルアミノ-、-オキシアリル、-オキシフェニル CO_2H 、
 -オキシフェニル SO_2H 、-オキシフェニルヒドロキシル、-オキシフェニル PO_2H 、
 -オキシ脂肪族、-オキシアルキル、-オキシ（脂肪族） CO_2H 、-
 オキシ（脂肪族） SO_2H 、-オキシ（脂肪族） PO_2H 、-オキシ（脂肪族）ヒ
 ドロキシル、-オキシアルカリル、-オキシアラルキル、-チオアリル、-チオ
 脂肪族、-チオアルカリル、-チオアラルキル、あるいは $-\text{NHCOO}-$ （
 アリルあるいは脂肪族）、 $-\text{O}-[(\text{CH}_2)_x\text{O}]_y-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ 、
 $-\text{O}-[(\text{CH}_2)_x\text{O}]_y(\text{CH}_2)_x\text{NH}(\text{CH}_2)_x\text{SO}_2\text{H}$ 、および $-\text{O}-[(\text{CH}_2)_x\text{O}]_y-$ （アリルあるいは脂肪族）、であり、ここで x は 1 乃至 8
 、また y は 1 乃至 20 の整数であり、また n は 10 および 20、000 の間にある
 基よりなるグループから選択される基、

であり得ることを特徴とする組成物。

6. ポリマーが多価陽イオンあるいは高分子電解質で架橋されることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の組成物。

7. ポリマーがアルジネートおよびホスファゼン高分子電解質の混合物であることを特徴とする請求の範囲第 4 項記載の組成物。

8. 請求の範囲第 1 項記載の組成物であって、ここで抗原が細胞、細菌、ウイルス粒子、およびそれらの一部から誘導される化合物よりなるグループから選択され、ここで化合物がタンパク質、ペプチド、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、核酸、あるいはその組合せよりなるグループから選択されることを特徴とする組成物。

9. 請求の範囲第 8 項記載の組成物であって、ここで抗原がロタウイルス、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、小児麻痺、A 型および B 型肝炎およびヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザ菌、破傷風菌、インフルエンザ、ジフテリア菌、および淋菌よりなるグループから選択される生体から誘導されることを特徴とする組成物。

10. ポリマーが抗原と共有接合されることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載

の組成物。

11. 組成物が更にムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド、サイトカイン、ジフテリア毒素、エキソトキシン A、コレラ毒素 A、コレラ毒素 B、および溶解性ホスファゼンよりなるグループからのアジュバントを含むことを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の組成物。

12. 極微粒子が胃の酸 pH から極微粒子を防護するコーティングの内部にあることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の組成物。

13. 動物に免疫応答を生じさせる一つの方法であって、免疫原性作用を誘発する抗原の有効量をカプセル化する生物適合性ポリマーで形成されるヒドロゲル極微粒子を含むワクチン組成物をその動物に投与する段階を含み、ここで極微粒子は直径が 200 ミクロンもしくはそれ以下である一つの方法。

14. マイクロスフェアが粘膜面に投与されることを特徴とする請求の範囲第 13 項記載の方法。

15. 粘膜面へのルートが気管内であることを特徴とする請求の範囲第 14 項記載の方法。

16. 粘膜面へのルートが鼻腔内であることを特徴とする請求の範囲第 14 項記載の方法。

17. 粘膜面が直腸および膣よりなるグループから選択されることを特徴とする請求の範囲第 14 項記載の方法。

18. 粘膜面へのルートが経目であることを特徴とする請求の範囲第 14 項記載の方法。

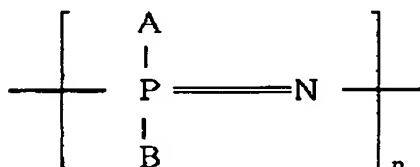
19. 粘膜面へのルートが非経口であることを特徴とする請求の範囲第 14 項記載の方法。

20. 極微粒子が 1 ミクロンから 15 ミクロンまでの直径を持つことを特徴とする請求の範囲第 13 項記載の方法。

21. 請求の範囲第 13 項記載の方法であって、ここでポリマーがアルジネート、ゼラチン、ペクチン、コラーゲン、ホスファゼン高分子電解質、ポリ(アクリルアミド)、ポリ

(メタクリルアミド)、ポリ(酢酸ビニル)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、スルホン酸ポリスチレン、ポリアミン、ポリ(ビニルピリジン)、およびそれらのポリマーおよびモノマーの混合物およびコポリマーよりなるグループから選択されることを特徴とする請求の範囲第13項記載の方法。

22. 請求の範囲第21項記載の方法であって、ここでホスファゼン高分子電解質が式：



のものであり、ここでAおよびBはポリマー内で独立して変化することが出来、それは

(i)使用条件の下で加水分解を受けやすい基、もしくは

(ii)使用条件の下で加水分解を受け難い基であり、脂肪族、アリル、アラルキル、アルカリル、カルボン酸、ヘテロ芳香族、ヘテロアルキル、(脂肪族)アミノ、ヘテロアラルキル、ジ(脂肪族)アミノ、アリルアミノ、ジアリルアミノ、アルキルアリルアミノ、-オキシアリル、-オキシフェニルCO₂H、-オキシフェニルSO₂H、-オキシフェニルヒドロキシル、-オキシフェニルPO₂H、-オキシ脂肪族、-オキシアルキル、-オキシ(脂肪族)CO₂H、-オキシ(脂肪族)SO₂H、-オキシ(脂肪族)PO₂H、-オキシ

(脂肪族)ヒドロキシル、-オキシアルカリル、-オキシアラルキル、-チオアリル、-チオ脂肪族、-チオアルカリル、-チオアラルキル、-NHCOO-(アリルあるいは脂肪族)、-O-[(CH₂)_xO]_y-(CH₂)_xNH₂、-O-[(CH₂)_xO]_y(CH₂)_xNH(CH₂)_xSO₂H、あるいは-O-[(CH₂)_xO]_y-(アリルあるいは脂肪族)、であり、ここでxは1乃至8、またyは1乃至20の整数であり、またnは10および20、000の

間にある基よりなるグループから選択される基、

であり得ることを特徴とする方法。

23. ポリマーがアルジネートおよびホスファゼンの混合物であることを特徴とする請求の範囲第21項記載の方法。

24. 請求の範囲第13項記載の方法であって、ここで抗原が細胞、細菌、ウイルス粒子、およびその一部より誘導される化合物よりなるグループから選択され、ここで化合物はタンパク質、ペプチド、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、核酸、あるいはその組合せよりなるグループから選択されることを特徴とする方法。

25. 請求の範囲第24項記載の方法であって、ここで抗原がロタウイルス、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、小児麻痺、A型およびB型肝炎およびヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザ菌、破傷風菌、インフルエンザ、ジフテリア菌、および淋菌よりなるグループから選択される生体から誘導されることを特徴とする方法。

26. ポリマーが抗原と共有接合されることを特徴とする請求

の範囲第13項記載の方法。

27. 請求の範囲第13項記載の方法であって、ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド、サイトカイン、ジフテリア毒素、エキソトキシンA、コレラ毒素A、コレラ毒素B、および溶解性ホスファゼンよりなるグループからのアジュバントを更に含むことを特徴とする方法。

28. 極微粒子が胃の酸pHから極微粒子を防護する材料と併用して投与されることを特徴とする請求の範囲第13項記載の方法。

29. 極微粒子が異なる放出速度を持つことを特徴とする請求の範囲第13項記載の方法。

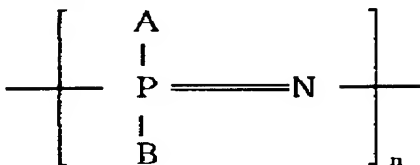
30. ワクチン組成物を製造する一つの方法であって、抗原の存在の下で生物適合性ポリマーのヒドロゲルを形成することにより200ミクロンあるいはそれ以下の直径を持つ極微粒子を形成することを含む方法。

31. 物理的架橋、共有結合架橋あるいはイオン架橋によりポリマーがヒドロゲルに形成されることを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

32. 請求の範囲第31項記載の方法であって、ここでポリマーがアルジネート、ゼラチン、ペクチン、コラーゲン、ホスファゼン高分子電解質、ポリ（アクリルアミド）、ポリ（メタクリルアミド）、ポリ（酢酸ビニル）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、スルホン酸ポリスチ

レン、ポリアミン、ポリ（ビニルピリジン）、およびそのポリマーおよびモノマーの混合物およびコポリマーよりなるグループから選択されることを特徴とする方法。

33. 請求の範囲第32項記載の方法であって、ここでポリマーは式：



のホスファゼン高分子電解質であり、ここでAおよびBはポリマー内で独立して変化することが出来、それは、

(i) 使用条件の下で加水分解を受けやすい基、もしくは

(ii) 使用条件の下で加水分解を受け難い基であり、脂肪族、アリル、アラルキル、アルカリル、カルボン酸、ヘテロ芳香族、ヘテロアルキル、（脂肪族）アミノ、ヘテロアラルキル、ジ（脂肪族）アミノ、アリルアミノ、ジアリルアミノ、アルキルアリルアミノ、-オキシアリル、-オキシフェニル C_6H_5 、-オキシフェニル SO_3H 、-オキシフェニルヒドロキシル、-オキシフェニル PO_3H 、-オキシ脂肪族、-オキシアルキル、-オキシ（脂肪族） CO_2H 、-オキシ（脂肪族） SO_3H 、-オキシ（脂肪族） PO_3H 、-オキシ（脂肪族）ヒドロキシル、-オキシアルカリル、-オキシアラルキル、-チオアリル、-チオ脂肪族、-チオアルカリル、-チオアラルキル、あるいは $-\text{NHCOO}-$ （アリルもしくは脂肪族）、 $-\text{O}-[(\text{CH}_2)_x\text{O}]_y-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ 、 $-\text{O}-[(\text{CH}_2)_x\text{O}]_y(\text{CH}_2)_x\text{NH}$

$(\text{CH}_2)_x\text{SO}_3\text{H}$ 、および $-\text{O}-[(\text{CH}_2)_x\text{O}]_y-$ (アリルもしくは脂肪族)、であり、ここで x は 1 乃至 8、また y は 1 乃至 20 の整数であり、また n は 10 および 20、000 の間にある基よりなるグループから選択される基、であり得ることを特徴とする方法。

34. 抗原の放出で調節された速度を達成するための特異的な分子量を持つポリマーを選択することを更に含むことを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

35. 抗原の放出で調節された速度を達成するための特定の分子量を持つ架橋陽イオンもしくはポリマー分子を選択することを更に含むことを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

36. 水状環境で分解速度を増加するために加水分解感受性ペンダント基を持つポリマーを選択することを更に含むことを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

37. 拍動放出を持つ免疫原性組成物を形成するために異なった放出速度を持つ抗原と一緒に含む極微粒子を混合することを更に含むことを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

38. ある極微粒子からの抗原放出が他の極微粒子よりもより長い時間後に行われるため延長した時間の放出が出来る免疫原性組成物を形成するために異なった放出速度を持つ抗原と一緒に含む極微粒子を混合することを更に含むことを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

ヒドロゲルマイクロカプセル化ワクチン

この発明は、水溶性ポリマーすなわちヒドロゲルに基づくマイクロスフェア（微小球体）の形をしたワクチン賦形剤である。

これは1993年7月12日受理された「免疫アジュバントとしてのホスファゼン高分子電解質」という名称の米国特許出願番号08/090,841号を部分継承するものである。

粘膜面を経由する免疫応答の誘導

多くのウイルスは粘膜面を一次感染部位として利用する。ウイルスにもよるが、感染は粘膜面に局在化して留まるか、もしくは全身感染を定着させるように転移するかのいずれかになる。局部感染を誘発するウイルスの例は呼吸粘膜で繁殖するインフルエンザ、パラインフルエンザおよび普通の風邪ウイルスであり、腸粘膜で複製するロタウイルスおよびノーウォーク因子である。粘膜から拡がり全身性ウイルス感染を誘導するウイルスは、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、ポリオ（小児麻痺）、A型およびB型肝炎、およびヘルペス等のウイルスである。

最近数年間に粘膜免疫の誘導に関する非常に多くの情報が蓄積された。例えば消化管において、免疫応答は消化管粘膜に包埋されたパイエル板に局在化される。これらの位置におけるリンパ系組織は消化管（消化管付随リンパ系組織、GALT）の

管腔に露出され、管腔内容物をたえず標本抽出することが可能となる。類似のリンパ系組織で細気管支付随リンパ系組織（BALT）は呼吸粘膜に位置する。

一般に多数のウイルスワクチンは、生弱毒化あるいは不活性化ウイルス製剤の注射の後、全身性防御免疫状態を定着させる。このようなワクチンの成功はワクチン受容者に細胞媒介およびもしくは体液性免疫応答を導入することによるものである。この全身性免疫は粘膜でのウイルス複製を減少させ、重要な標的器官へのウイルス拡散を除去することにより疾病の発病を予防する。

注射可能ワクチンの使用は多くのウイルス疾病発生率を劇的に減少させた。それにも拘らずこれらの使用は何らかの望ましくない作用と関連する。生弱毒化ウ

イルスワクチンは全身性合併症を起こすことがあり、一方不活性化ワクチンは局所反応を引き起こし、アレルギー状態を誘発することさえある。前者は免疫を減少させ自然感染の割合を増加させ、一方後者は現在のワクチンの改良および新しいワクチンの開発を妨げる。

注射可能ワクチン使用の代替的方法是抗原とりわけ生弱毒化ウイルスの経口投与である。このようなワクチンは野生型ウイルスの自然感染により誘発される免疫応答によく似た強力な粘膜および全身性免疫の双方を誘導する。この免疫応答の布置はウイルスの全身性拡散だけでなく粘膜でのウイルス複製をも除去する。かくして複製経口ワクチンにより引き出される免疫応答は注射可能生ワクチンあるいは不活性化ワクチンにより誘導されるものよりも優れている。この種のワクチンの最良の例

は、生弱毒化経口ポリオウイルスワクチン（OPV）である。不幸にも生ワクチンの経口投与は胃を通過しても生存し、またたやすく病原力に戻らない生ウイルスに限定される。

これまでに開発されたもっとも効果的な非複製抗ウイルスワクチンは不活性化ウイルス粒子であった。動物モデルにおいてペプチドおよびサブユニットワクチンの効力は限られた成功しかおさめられず、現在このような種類の製剤を使用するヒトワクチンは存在しない。組換えDNA操作の初期の年代では、多くのグループの人が防御免疫の開発のみでなく非感染性ウイルス抗原による安全性の問題の解決をも十分に期待した。不幸なことに、実験室での発現ベクターで生産され、高度に精製されワクチンを受ける人に注射されたウイルスタンパク質が、自然感染で見出される抗原状態に僅かではあるが近似する生体内立体配座をとると仮定する理由のないことが次第に明らかになってきた。今日では、唯一の成功した組換え誘導ワクチンは真核（酵母）発現システムで合成されたB型肝炎表面（HBs）抗原であった。

微粒子状態にある非複製抗原の経口提示が自然感染により誘導される免疫に非常によく似る粘膜および全身性免疫の双方を誘導することを立証する証拠が多くなろうとしている。これは全身免疫を誘導することを果せないだけでなくしばし

ば全身寛容性の状態を誘導する非複製可溶性抗原による経口免疫と著しい対照をなす。更にこの免疫を引き出すのに必要な抗原用量は同じ抗原を用いる非経口免疫化に必要とされる容量よりもはるかに低い。このようなワクチン製剤に固有の主な利点は投与が

簡単で完全に安全であることである。

アジュバント

近代分子生物学の到来は前例のないような簡単さと精度でもって免疫原を生産する手段を提供した。これらの新しい方法が有効なアジュバントの不在下では一般に強力な免疫応答を誘導しない精製免疫原を生成するということは皮肉なことである。ヒトに使用される改良されたワクチンアジュバントの開発は従って最優先の研究領域となった。にも拘らずアジュバントの研究は免疫原について行われた作業からひどく遅れた。数十年にわたりヒトに広く使用されたアジュバントはミョウバンであった。サポニンおよびその精製成分であるクイルA (Quil A)、フロイト完全アジュバントおよび研究や獣医学的適用で使用される他のアジュバントは毒性を持ち、それがヒトワクチンへの潜在的な使用を制限する。ムラミルジペプチドおよび脂質Aモノホスホリルなどのような新しく化学的に定着される製剤が研究されている。

アジュバントがその作用をどのように働かせるかについてのこれまでの見解は、鉱油乳濁液あるいは水酸化アルミニウムのようなアジュバントが抗原をゆるやかに放出する注射の部位で抗原のデポ（貯蔵所）を形成するというものである。しかし3日後注射部位の切除が免疫応答には殆ど作用していないことを示した。最近の研究は、A. C. アリソンおよびN. E. バイヤーズ「ワクチン：免疫学上の諸問題への新しいアプローチ」R. W. エリス編、431ページ（バターワース-ハイネマン

社、オクスフォード、1992年）で検討されたようにサイトカインの放出によりアジュバントが免疫応答の特異的でしかも時には非常にせまいアームを刺激することによって免疫応答を高めることを示している。長い期間にわたり抗原の放

出のための簡単な貯蔵所として機能するアジュバントを持つことが望ましい。

最近数年間にわたり開発されたアジュバント研究領域は、ワクチン製剤におけるポリマーの利用である。ハンター、R. L. の「非イオン性ブロックコポリマー界面活性剤」ワクチンアジュバント研究における問題、D. R. スプリングスおよびW. C. コッフ編、89-98ページ（CRCプレス社、1991年）は分子量が約10,000以下で単一ブロックの疎水性ポリオキシプロピレン（POP）に隣接する2個のブロックの親水性ポリオキシエチレン（POE）で構成される単純な構造を持っている。これらは界面活性剤としては毒性がもっとも少ないものと考えられ、食品、医薬品および化粧品に広く使用されている。大型の疎水性コポリマーのいくつかは有効なアジュバントであり、一方、密接に関連した製剤はそうではない。POEおよびPOPの連鎖に差異を持つこれらのコポリマーのアジュバント活性の間には相関が存在する。現在ではこれらのアジュバントは油性および水性乳濁液で使用されている。

各種の分子量を持つ広い範囲の高分子電解質がアジュバント活性を持つものとしてベトロフ、他、ソビエト医学評論、セクションD、免疫学、4巻、1-113ページ（1992年）で

示されている。ここでは正もしくは負の電荷のいずれかを持つ高分子が類似の免疫刺激活性を示した。高分子電解質は静電気および疎水結合を通じて抗原とともに複合体を形成する。一方中性および非負荷ポリマーは免疫応答に何らの影響も与えなかった。

薬剤および抗原の調節放出

調節放出ワクチンの開発に現在かなりの関心が寄せられている。その理由は現在利用出来るいくつかのワクチンの不利な点の主なものは、それを繰返して投与するということである。ワクチンの調節放出が可能であればブースター（追加抗原）免疫の必要性は無くすることが出来る。これは特に開発途上国では有利であり、そこでは健康管理担当者とワクチン受容者との間の接触を頻繁に繰返すことはしばしば困難であるからである。濾胞樹状細胞およびリンパ節器官の外膜に持続する抗原が抗体分泌細胞を形成するためにB記憶細胞の補給に含まれる証拠が多

くならうとしている。循環抗体の連続放出は、この補給が連続的に行われていることを示唆している。抗原の水準が減少するにつれて、これは発生する抗体の親和性成熟という十分に確立された現象の存在を可能にする。抗原持続概念の受容は、ワクチン開発において重要な意味を持つ。理想的には抗原が免疫系に提供され、特に濾胞樹状細胞にこれまでよりも拡大された期間にわたり抗原が提供されるようにワクチンを製剤出来るということによって有利となるであろう。

多くのポリマーが抗原およびその他タンパク質や化合物をと

りこむために用いられてきた。これの初期の例はインフルエンザ抗原を口径1ミクロン(1,000ナノメートル)以下のメチルメタクリレート内で重合して所謂ナノ粒子を形成したもので、クロイター, J., 医学および薬理学におけるマイクロカプセルおよびナノ粒子, M. ドンブロー(編)、125-148ページ(CRCプレス)により報告された。抗体応答ならびにインフルエンザウイルスの感染に対する防御は抗原が水酸化アルミニウムと併用して投与される時に著しく改善された。他の粒子を用いた実験はこれらのポリマーのアジュバント効果が粒子のサイズおよび疎水性に依存することを示した。

いくつかの要因がマイクロカプセル化のための特定のポリマーの選択に寄与する。ポリマー合成の再生産可能性およびマイクロカプセル化工程、マイクロカプセル化材料および工程のコスト、毒物学プロファイル、ポリマーおよび抗原の放出速度および物理化学的親和性、などが考慮されねばならないすべての要因である。

生物分解性ポリマーは多くのタイプの不安定結合の一つの周囲に設計される。その例はポリカーボネート、ポリエステル、ポリウレタン、ポリオルソエステルおよびポリアミドである。自然発生ポリマーに比べてマイクロカプセル化のため合成ポリマーを使用する利点の一つは、中立条件の下でこれらの結合の加水分解の相対的割合がポリマーバックボーンに対する置換基により影響され得るということである。置換基修飾もまたポリマーの溶解性および親水性／疎水性を変化させるのに使用出来る。

薬剤の、つい最近では抗原の担体としてしばしば選択されるものはポリ (D, L-ラクチド-コ-グリコリド) (PLGA) である。調節当局による受容性はいずれの抗原デリバリシステムに対しても著しい障害として残っている。PLGA ポリマーは長年にわたり分解吸収可能な縫合糸として使用されてきた生物分解性および生物適合性ポリエステルであり、エルドリッジ, J. H. 他、微生物学および免疫学における今日の諸問題、1989年、146巻、59-66ページで論評されている。直径1乃至10ミクロンのPLGAマイクロスフェアへの抗原のとり込みはアジュバント効果を持つものとして示される。

PLGA システムの主に不利な点は有機溶媒の使用と抗原のマイクロカプセル化に長い調製時間がかかることである。この工程は油中水型乳剤の位相分離を利用する。対象となる化合物は水溶液として準備され、PLGAは塩化チメレンおよび酢酸エチルなどの適切な有機溶媒に溶解される。これら2種の不混和性溶液は高速攪拌により共同乳濁化される。ポリマーの非溶剤が次いで加えられ、水状液滴のまわりにポリマーの沈殿を生じ胚マイクロカプセルを形成する。

マイクロカプセルは集められ、ポリビニルアルコール (PVA)、ゼラチン、アルジネート、ポリビニルピロリドン (PVP)、あるいはメチルセルロースなどの高分子電解質で安定化され、溶媒は真空内で乾燥もしくは溶媒抽出で除去された。これらの調製条件は、J. H. エルドリッジ、他、感染と免疫、9巻、2978ページ (1991年) で示されたよう

に、多種多様なペプチド薬剤およびブドウ球菌腸毒素Bやキーホールリンペットシアニンなどの抵抗力の強い免疫原のマイクロカプセル化にはうまく成功したが、PLGAを使用するマイクロカプセル化に必要な高い剪断力、有機溶媒の使用および長い調製時間は、エンベロープウイルスなどのような複合不安定免疫原の重要なエピトープに対して障害となり得る。

従ってこの発明の一つの目的には、有機溶媒あるいは長い調製時間必要としないワクチンのカプセル化および非経口あるいは粘膜投与によるデリバリ材料を提供することである。

この発明のも一つの目的は粘膜面とりわけ経口デリバリを通じて抗原のデリバ

リを行うためのシステムを提供することである。

更にこの発明の目的は、免疫原性応答の広いスペクトルを引き出す抗原のためのデリバリシステムを提供することである。

また更にこの発明の目的は、ワクチンの免疫原性を高めるワクチンのデリバリのためのデリバリシステムを提供することである。

また更にこの発明のも一つの目的は、抗原の調節放出を提供する生物分解性デリバリシステムを提供することである。

発明の要約

水溶性ポリマーおよびポリマーヒドロゲルは粘膜面へのデリバリ、粘膜面での抗原の調節放出、あるいは注射（非経口投与）のための抗原のマイクロカプセル化のために使用される。

もっとも望ましい実施例において、カプセル化抗原は経口あるいは鼻腔内で投与される。ポリマーは生物適合性、架橋可能水溶性ポリマーあるいはポリマーヒドロゲルのいずれかであることが出来、それはそこにくみ込まれる抗原に緩やかでそれを変性しない条件の下で200ミクロンもしくはそれ以下の直径を持つ極微粒子を形成するために使用出来る。望ましい天然の水溶性ポリマーは、アルジネート、ゼラチン、ペクチン、およびコラーゲンである。望ましい合成水溶性ポリマーは、ポリ（アクリルアミド）、ポリ（メタクリルアミド）、ポリ（酢酸ビニル）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（エチレングリコール）、ポリビニルアミン、ポリ（ビニルピリジン）、ホスファゼン高分子電解質、およびポリ（ビニルアルコール）である。イオン架橋によりヒドロゲルを形成する望ましいポリマーはポリ（アクリル酸）あるいはポリ（メタクリル酸）の塩、スルホン化ポリスチレン、ポリアミンあるいはポリ（ビニルピリジン）の第4級塩、およびそれらのポリマーあるいはモノマーの混合物もしくはコポリマーである。もっとも望ましいポリマーはアルジネート、ポリホスファゼン、およびその混合物である。

カプセル化抗原を調製するために、抗原はポリマー溶液と混合され、極微粒子は有機溶媒の有効量を使用することなしにポリマーと抗原から急速に形成され、

またポリマーは安定した生物分解性極微粒子を形成するためにイオンもしくは共有結合で架橋される。極微粒子は胃腸管の粘膜内層のような粘膜面に粘着し、時間の経過で放出されるように抗原の細網内皮細胞によ

りとり入れを増加させる。ポリマーは望ましくはアルジネートあるいはポリホスファゼンであり、もっと望ましくは塩化カルシウムのような多価イオンもしくは二価の陽イオンでイオン架橋されたものである。

実施例は、単独もしくはコレラ毒素のような粘膜作用薬と併用してポリマーカプセル化抗原の免疫原性の向上を示し、また非経口、経口、あるいは鼻腔内に投与する時に放出割合および体液性応答を変えるためにどのようにポリマーを操作するかを示す。

図面の簡単な説明

図1はポリホスファゼンマイクロスフェアの浸透性のグラフであり、カプセル化タンパク質分子量およびポリマー濃度と同じく放出パーセントで測定されたものである。レインボータンパク質マーカーが3種の濃度：3.3%（斑点棒）、2.5%（平行線棒）および1.5%（黒色棒）のポリ[ジ（カルボキシルアトフェノキシ）ホスファゼン-コージ（グリシナート）ホスファゼン]（PP）にマイクロカプセル化され、上澄みの一定量のタンパク質が分光光度で分析される前に、24時間室温でpH7.4 HEPES緩衝液で保温された。

図2はポリホスファゼンマイクロスフェアの侵食プロフィールに関する分子量の作用を示すグラフであり、130キロダルトンPC-GIP（四角）、3,900キロダルトンPCPP（ダイヤモンド）、170キロダルトンPC-GIP（円）、および400キロダルトンPCPP（三角）の日数で表される

期間での質量損失パーセントで測定される。

図3aおよび3bはポリホスファゼンの異なる出発分子量によるPCPPヒドロゲルの日数で表される期間での分子量分解プロフィールであり、Mwは分子量、Mnは数量平均分子量、当初分子量は3,900キロダルトン（図3a）および400キロダルトン（図3b）である。

図4はマトリックスにあるポリマー分子量と溶液にあるポリマー分子量とを比較する分子量170キログルトンのPC-GIPPヒドロゲルの日数で表される期間での分子量分解プロフィールである。

図5は異なる分子量：12,000mw（四角）、62,500mw（ダイヤモンド）、140,800mw（円）、および295,000mw（三角）のポリ-L-リシンで被覆されたポリホスファゼンからのポリスチレンビードの放出パーセントのグラフである。直径20nmの長さである蛍光ポリスチレン（PS）ビードがポリマー1でカプセル化され、次いで異なる分子量のポリ-L-リシンで被覆された。被覆ビードはpH7.4のHEPES緩衝液を使って室温で保温された。上澄み内に放出されるポリスチレンビードは定量蛍光光度法で測定され、最初にカプセル化されたビードのパーセントで表された。

図6a、6bおよび6cは、懸濁液のfluウイルスで免疫化された動物の血清（図6a）、アルジネートマイクロスフェアのコレラ毒素（CT）と併用したカプセル化fluウイルス（図6b）、およびアルジネートマイクロスフェア内でカプセ

ル化されたfluウイルス（図6c）のflu特異的応答のグラフであり、それは7、14、21、および28日で（左側から右側に向けてIgM、黒色棒、IgG、平行線棒、IgA、斑点棒の順で）抗体力価として測定される。

図7はCTと併用してアルジネート内にカプセル化されたインフルエンザの経口投与に続く血清のflu特異的抗体応答であり、IgM、黒色棒、IgG、平行線棒、IgA、斑点棒で免疫後7、14、21、28および35日に測定された。

図8はCTと併用するアルジネートのマイクロカプセルでインフルエンザの経口投与後、経口ブーストの後に糞サンプルでのflu特異的抗体のグラフであり、IgM、黒色棒、IgG、平行線棒、IgA、斑点棒で示したブースト後7、14、21、28および35日後に測定された。

発明の詳細な説明

一般に抗原のデリバリのためのマイクロスフェアは水溶性ポリマーもしくはヒ

ドロゲルを形成するポリマーの共有結合あるいはイオン架橋により形成される。望ましい実施例において、ポリマーは水溶性ヒドロゲルカプセル化抗原を形成するカルシウムイオンのような二価陽イオンでイオン架橋されるアルジネートもしくはポリホスファゼンなどの水溶性ポリマーで形成される。抗原は抗原の分散がマイクロスフェアに確実に行き渡るように架橋に先立ちポリマー溶液と混合される。より安定したポリマーはマイクロスフェアをポリアミノ酸のような高分子電解質と更に架橋させることで形成することが出来る。

マイクロスフェアを作るのに有用なポリマー

ポリマーは大体生物分解性、架橋可能水溶性ポリマーあるいは重合性ヒドロゲルであり、そこにとり込まれる抗原におだやかで変性させない条件の下で10ミクロンもしくはそれ以下の直径を持つマイクロスフェアを形成することが出来る。ここで使用されるようにヒドロゲルはいずれかの水膨張性ポリマーと定義される。水溶性ポリマーは水、水緩衝生理食塩水あるいは水性アルコール溶液に（典型的には少なくとも重量で0.001%の範囲まで）少なくとも部分的に溶解するポリマーである。望ましい天然水溶性ポリマーは、アルジネート、ゼラチン、ペクチン、およびコラーゲンを含む。望ましい合成水溶性ポリマーは、ポリ（アクリルアミド）、ポリ（メタクリルアミド）、ポリ（酢酸ビニル）、ポリ（Nビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（エチレングリコール）、ポリビニルアミン、ポリ（ビニルピリジン）、ホスファゼン高分子電解質、およびポリ（ビニルアルコール）を含む。イオン架橋によりヒドロゲルを形成する望ましいポリマーは、ポリ（アクリル酸）あるいはポリ（メタクリル酸）、スルホン酸ポリスチレン、ポリアミンあるいはポリ（ビニルピリジン）のいずれかの第4塩、およびポリマーあるいはそのモノマーの混合物およびコポリマーを含む。もっとも望ましいポリマーはアルジネート、ポリホスファゼンおよびその混合物を含む。

ポリマーは水溶性ポリマーを非水溶性にするイオン架橋、共

有結合架橋あるいは物理的架橋により架橋することが出来る。室温での水ベース

のポリマー溶液のイオン架橋によるゲル化が、有機溶媒に対する長期間の被曝、温度の上昇および有機溶媒に溶解するポリマーに必要な乾燥を除去する。ポリマーは、もしポリマーが酸性側基を持つ場合には多価陽イオン、あるいはポリマーが塩基性側基を持つ場合には多価陰イオンというように、電荷された側基とは逆の電荷を持つ多価イオンを含む水溶液内で架橋され得る。望ましくは、2価あるいは3価の金属イオン、例えばカルシウム、銅、アルミニウム、マグネシウム、ストロンチウム、バリウム、錫、亜鉛、および鉄、もしくは多価陽イオン、例えばポリ(アミノ酸)、ポリ(エチレンジアミン)、ポリ(ビニルアミン)、ポリ(ビニルピリジン)、多糖類、および高分子電解質複合体と形成出来る他のものにより架橋される。

アルジネート

もっともよく研究されたイオン架橋可能ポリマーは天然に生じるアルジネートであり、これは食料に供される褐藻類、例えばブロンタナルLF20/60(米国、ニューハンプシャー、ポーツマス、プロノヴァ、インコーポレイテッド)から調製される。

ポリマーは望ましくは塩化カルシウムあるいは他の2価もしくは多価陽イオンを使用する多価イオンで架橋結合される。

ポリホスファゼン

一組のイオン架橋水溶性ポリホスファゼンの説明で、H. R. オールコックおよびS. クォン、高分子、22巻、75-79ページ(1989年)、に記述されているが、それは調製にわたって水性環境のみに被曝される抗原を含むマイクロスフェアの生成を可能にした。

ここで使用されるアミノ酸という用語は天然および合成アミノ酸の両方を指示し、必ずしもそれに限定されないが、アラニル、バニル、ロイシニル、イソロイシニル、プロリニル、フェニルアラニニル、トリプトファニル、メチオニニル、グリシニル、セリニル、トレオニニル、システイニル、チロシニル、アスパラギニル、グルタミニル、アスパルトイル、グルタオイル、リシニル、アルギニニル、およびヒスチジニルを含む。

アミノ酸エステルの用語は、天然もしくは合成アミノ酸の脂肪族、アリルあるいはヘテロ芳香族カルボン酸エステルを指示する。

ここで使用されるアルキルは、飽和直鎖、分岐あるいは環状炭化水素、もしくはその組合せで、典型的に C_1 から C_{10} までのものであり、特にメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 t -ブチル、ペンチル、シクロペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、シクロヘキシル、3-メチルペンチル、2, 2-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、ヘプチル、オクチル、ノニル、およびデシルを含む。

(アルキルあるいはジアルキル) アミノの用語はそれぞれ

1個もしくは2個のアルキル置換基を持つアミノ基を指示する。

ここで使用するアルケニルおよびアルキニルという用語は、それぞれ二重あるいは三重結合を少なくとも1個持つ C_2 から C_{10} までの直鎖あるいは分岐炭化水素を指示する。

ここで使用されるアリルという用語は、フェニルあるいは置換フェニルを指示し、ここで置換基はハロ、アルキル、アルコキシ、アルキルチオ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、メチレンジオキシ、シアノ、 $C(O)$ (下級アルキル)、 $-CO_2H$ 、 $-SO_3H$ 、 $-PO_3H$ 、 $-CO_2$ アルキル、アミド、アミノ、アルキルアミノおよびジアルキルアミノ、およびここでアリル基は3個までの置換基を持つことができる。

脂肪族という用語は、典型的には C_1 から C_{10} の炭化水素を指示し、それはアルキル、アルケニル、アルキニル成分の一つもしくはその組合せを含むことが出来、直鎖、分岐、あるいは環状もしくはその組合せでもあり得る。

ここで使用されるハロという用語はフッ素、塩素、臭素、およびヨウ素を含む。

アラルキルという用語は、アルキル置換基を持つアリル基を指示する。

アルカリルという用語は、ベンジル、置換ベンジル、フェネチル、あるいは置換フェネチルを含むアリル置換基を持つアルキル基を指示し、ここで置換基はアリル基として前記定義の通りである。

ここで使用されるヘテロアリルあるいはヘテロ脂肪族という用語は、少なくとも1個の硫黄、酸素、あるいは窒素を芳香族環に含み、アリル基として前記記載の通り場合によっては置換される。限定されない例として、フリル、ピリジル、ピリミジル、チエニル、イソチアゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ピラジニル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、キノリル、イソキノリル、ベンゾチエニル、イソベンゾフリル、ピラゾリル、インドリル、イソインドリル、ベンジミダゾリル、プリニル、カルボゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、1, 2, 4-チアジアゾリル、イソオキサゾリル、ピロリル、ピラゾリル、キナゾリニル、ピリダジニル、ピラジニル、シノリニル、フタラジニル、キノキサリニル、キサンチニル、ヒポキサンチニル、プテリジニル、5-アザシチジニル、5-アザウラシリル、トリアゾロピリジニル、イミダゾロピリジニル、ピロロピリミジニル、およびピラゾロピリミジニルがある。

「調剤許容イオン」の用語は、電荷を運び、ホスファゼン高分子電解質における対抗イオンとして投与することの出来る有機あるいは無機成分を指示する。

ここで使用されるヘテロアルキルという用語は炭素鎖にありあるいは炭素鎖を終結させる（水素あるいは酸素で完成される原子価を持つ）酸素、硫黄、あるいは窒素のようなヘテロアトム（異種原子）を含むアルキル基を支持する。

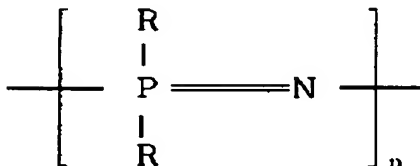
ここで使用されるポリ〔（カルボキシルアトフェノキシ）（グリシナート）ホスファゼン〕、ポリ〔ジ（カルボキシルア

トフェノキシ）ホスファゼン-コ-ジ（グリシナート）ホスファゼン-コ-（カルボキシルアトフェノキシ）（グリシナート）ホスファゼン〕およびポリ〔ジ（カルボキシルアトフェノキシ）ホスファゼン-コ-ジ（グリシナート）ホスファゼン〕は同ポリマーを指示する。

ポリホスファゼンは望ましくはその対抗イオンと釣り合う酸あるいは塩基の形態、もしくはそのイオン塩の形態のいずれかで、電荷側基を含む。

ポリマーは望ましくは生物分解性であり、ヒトを含む動物に投与される時に最小の毒性を示す。

ポリホスファゼンは交互する単一および二重結合により分離される交互するリンおよび窒素よりなるバックボーンを持つポリマーである。各リン原子は2個のペンダント基（“R”）に共有結合される。ポリホスファゼンの反復単位は下記の一般式



を持ち、ここで n は整数である。

置換基（“R”）はポリマー内で変化出来る種々様々な成分であることが出来、必ずしもそれに限定されないが、脂肪族；アリル；アラルキル；アルカリル；カルボン酸；ヘテロ芳香族；グルコースを含む炭水化物；ヘテロアルキル；ハロゲン；

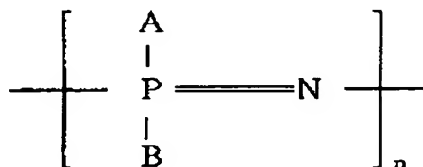
アルキルアミノーを含む（脂肪族）アミノー；ヘテロアラルキル；ジアルキルアミノー、アリルアミノ、ジアリルアミノー、アルキルアリルアミノーを含むジ（脂肪族）アミノー；必ずしもそれに限定されないが－オキシフェニルCO₂H、－オキシフェニルSO₂H、－オキシフェニルヒドロキシルおよび－オキシフェニルPO₂Hを含む－オキシアリル；－オキシアルキル、－オキシ（脂肪族）CO₂H、－オキシ（脂肪族）SO₂H、－オキシ（脂肪族）PO₂Hを含む－オキシ脂肪族；および－オキシ（アルキル）ヒドロキシル、－オキシアルカリル、－オキシアラルキル、を含む－オキシ（脂肪族）ヒドロキシル；チオアリル；－チオアルキル、－チオアルカリル、－チオアラルキルを含むチオ脂肪族；－NHCO（O）O－（アリルあるいは脂肪族）、－O－[(CH₂)_xO]_y－(CH₂)_xNH₂、－O－[(CH₂)_xO]_y（CH₂)_xNH（CH₂)_xSO₂H、および－O－[(CH₂)_xO]_y－（アリルあるいは脂肪族）であり、ここでは x は 1 から 8 で y は 1 から 20 までの整数である。この基は例えば酸素、硫黄、窒素、あるいは炭素原子を経てリン原子と結合することが出来る。

一般にポリホスファゼンが一種以上のペンダント基を持つ場合には、この基は

ポリマー内をランダムに変化し、従ってポリホスファゼンはランダムコポリマーである。リンは2個の類似の基あるいは2個の異なった基に結合することが出来る。ポリホスファゼンで2個もしくはそれ以上の種類のペンダント基を持つものは、ポリ(ジクロロホスファゼン)を1個もしくは複数の救核基を望ましい割合で反応させて生産することが出来る。

る。ポリホスファゼンでペンダント基の生成する割合は、ポリマーを生産するのに使用される出発材料の割合、救核基置換反応が実施される温度、および使用される溶媒系などを含む多くの要因で決定される。生成ポリマー内の基の正確な置換パターンを決定するのは非常に難しいが、一方、ポリマー内の基の割合は当業者の1人により容易に決められることが出来る。

一つの実施例において、生物分解性ポリホスファゼンは下記の式；



を持ち、ここでAおよびBは独立してポリマー内で変化することが出来る、以下の基であることが出来る。

(i) 使用条件の下で加水分解を受け易い基で必ずしもそれに限定されないが、塩素、アミノ酸、(アミノ基を通じて結合する)アミノ酸エステル、イミダゾール、グリセロール、あるいはグルコシルなどを含む基、あるいは

(ii) 使用条件下で加水分解を受け難い基で、必ずしもそれに限定されないが、脂肪族；アリル；アラルキル；アルカリル；カルボン酸；ヘテロ芳香族；ヘテロアルキル；アルキルアミノーを含む(脂肪族)アミノー；ヘテロアラルキル；ジアルキルアミノー、アリルアミノー、ジアリルアミノー、アルキルアリルアミノーを含むジ(脂肪族)アミノー；それに限定されないがーオキシフェニルCO₂H、ーオキシフェニルSO₂H、ーオキシフェニルヒドロキシル、およびーオキシフェニル

P O, Hを含む－オキシアリル；－オキシアルキル、－オキシ（脂肪族）C O, H、－オキシ（脂肪族）S O, H、－オキシ（脂肪族）P, O, Hを含む－オキシ脂肪族；－オキシ（アルキル）ヒドロキシルを含む－オキシ（脂肪族）ヒドロキシル；－オキシアルカリル；－オキシアラルキル；チオアリル；－チオアルキル、－チオアルカリル、あるいはチオアラルキルを含む－チオ脂肪族、などの基。

ここでポリマーは、使用条件の下で加水分解を受け難い反復単位を少なくとも1%もしくはそれ以上、望ましくは10%もしくはそれ以上、またより望ましくは80乃至90%もしくはそれ以上で100%以下で含み、また、

nは4もしくはそれ以上、また望ましくは10から20, 000までの整数である。

イミダゾール以外のヘテロ芳香族基のようなある種の基は、血液内で見出されるような中性水性条件の下では極端にゆっくりした割合で加水分解し、従ってここでの目的のためには典型的に非加水分解基と見做されることは理解されねばならない。しかし例えば胃内で見出される例えば低pHのような条件下では、（イミダゾール以外のヘテロ芳香族のような）通常は非加水分解基の加水分解の割合は、ポリマーの生物分解性が影響される点まで増加することがあり得る。十分に周知の技術を使用する当業者の1人は、ペンダント基が使用条件の下で有意の割合で加水分解するかどうかをたやすく決定することが出来る。当業者の1人はまたここに記載された異なった構造を持つポリホスファゼンの加水分解率を決定することが出来るし、標的用

途での望ましい生物分解プロフィールを提供するポリホスファゼンを選択することも出来るであろう。

ポリマーの加水分解性の度合は、加水分解を受けやすいペンダント基の割合および加水分解可能基の加水分解率の関数となるであろう。加水分解可能基は、ポリマーに加水分解不安定性を与えるP－OH結合を提供するために、水状環境下でヒドロキシル基により代替される。

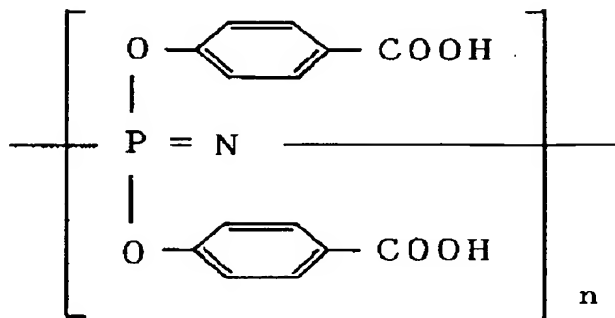
他の実施例においては、ポリホスファゼンは、（i）ポリマーのペンダント基のいずれもあるいは事実上いずれも使用条件の下で加水分解を受けない非生物分

解性ポリホスファゼン、あるいは、(ii) 使用条件の下で（例えばポリ〔ジ（エチルグリシナート）-ホスファゼン〕のように）すべての基が加水分解を受けやすい完全に生物分解性ポリホスファゼン、である。

ホスファゼン高分子電解質はここでポリホスファゼンに陰イオン、陽イオン、あるいは両染色性を付与するイオン化もしくはイオン化可能ペンダント基を含有するポリホスファゼンと定義される。イオン基は塩、あるいは少なくとも部分的に解離することの出来る酸もしくは塩基の形をとることが出来る。いずれかの薬理的に許容出来る単価陽イオンは、必ずしもそれに限定されないが、ナトリウム、カリウムおよびアンモニウムを含む塩の対抗イオンとして使用することが出来る。更にホスファゼン高分子電解質は、非イオン側基を含むことが出来る。ホスファゼン高分子電解質は使用条件の下で生物分解性もしくは非生物分解性であることも出来る。イオン化もしくはイオン化可

能ペンダント基は使用条件の下では望ましくは加水分解を受け難いものである。

望ましいホスファゼン高分子電解質はカルボン酸、スルホン酸、あるいはヒドロキシル成分を含むペンダント基を含有する。酸性基は通常非加水分解ペンダント基にあるが、それは代替的にあるいは組合せとして加水分解可能基に位置することもある。カルボン酸基を側鎖として持つホスファゼン高分子電解質の例は下記の式：



で示され、ここでnは整数であり、望ましくは10から10,000までの間の整数である。このポリマーはポリ〔ジ（カルボキシルアトフェノキシ）ホスファゼン〕あるいは代替的にポリ〔ビス（カルボキシルアトフェノキシ）ホスファゼン〕（PCPP）という化学名を持つ。

ホスファゼン電解質は望ましくは生物分解性である。ここで使用される生物分解性という用語は、約25℃-37℃の温度で一度pH6-8の生理溶液に曝されると、典型的には約5年以内でもっとも望ましくは1年以内に望ましい用途で使用する期間内で分解するポリマーである。

もっとも望ましくは、ポリマーは使用条件の下で加水分解し

ないカルボン酸成分を含むペンダント基および使用条件の下で加水分解を受けやすいペンダント基を含むポリ(オルガノホスファゼン)である。加水分解感受性基を持つ望ましいホスファゼン高分子電解質の例は、特にポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン-コ-ジ(グリシナート)ホスファゼン-コ-(カルボキシルアトフェノキシ)(グリシナート)ホスファゼン、およびポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン-コ-ジ(クロロ)ホスファゼン-コ-(カルボキシルアトフェノキシ)(クロロ)ホスファゼン]を含むポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン-コ-ジ(アミノ酸)ホスファゼン-コ-(カルボキシルアトフェノキシ)(アミノ酸)ホスファゼン]である。

ポリホスファゼンの毒性は、当業者に周知の細胞培養実験を用いて測定される。例えばポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン]の毒性は、細胞培養皿をポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン]で被覆する細胞培養で測定された。ニワトリ胚芽繊維芽細胞は次いで被覆ペトリ皿に接種された。ニワトリ胚芽繊維芽細胞を接種3日後に細胞は平坦になり紡錘形を形成した。位相差顕微鏡の下で、有糸核分裂像が観察された。これらの観察は細胞を複製するためにポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン]の無毒性の証拠を提供する。

架橋ポリホスファゼンは、ホスファゼン高分子電解質を、亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、あるいはカドミウム

などの金属多価陽イオンと結合させることにより調製することが出来る。

ホスファゼン高分子電解質の合成

ホスファゼン高分子電解質を含むポリホスファゼンは、当業者にとって既知の方法に従って、ポリ（ジクロロホスファゼン）を広範囲の化学試薬もしくは試薬の混合物と反応させる高分子求核置換反応により調製することが出来る。望ましくは、ホスファゼン高分子電解質はポリ（ジクロロホスファゼン）を塩素を置換する適切な求核試薬と反応させることにより作られる。ポリマーの非加水分解側鎖に対する加水分解可能側鎖の望ましい割合は、ポリ（ジクロロホスファゼン）と反応する対応する求核試薬の量および必要とされる反応を調節することにより得ることが出来る。

例えば、ポリ〔（カルボキシルアトフェノキシ）-（グリシナート）ホスファゼン〕（PC-G1PP）は、ポリ（ジクロロホスファゼン）の塩素原子をプロピル-P-ヒドロキシベンゾエートおよびエチルグリシナートヒドロクロライドと求核置換反応させることにより調製される（PC-G1PP合成）。このようにして得られたポリ〔（アリルオキシ）（グリシナート）ホスファゼン〕エステルは、次いで対応するポリ（カルボン酸）に加水分解される。他のポリホスファゼンは、オールコック、H. R., 他、無機化学、11巻、2584ページ（1972年）；オールコック、H. R., 他、高分子、16巻、715ページ（1983年）；オールコック、H.

R., 他、高分子、19巻、1508ページ（1986年）；オールコック、H. R., 他、バイオマテリアル（生体組織接触部位補綴用物質）、19巻、500ページ（1988年）；オールコック、H. R., 他、高分子、21巻、1980ページ（1988年）；オールコック、H. R., 他、無機化学、21巻（2）、515-521ページ（1982年）；オールコック、H. R., 他、高分子、22巻、75-79ページ（1989年）；米国特許番号4,440,921号、4,495,174号、4,880,622号、オールコック、H. R., 他；米国特許番号4,946,938号、マッギール、他；米国特許番号5,149,543号、コーエン、他；およびグローマン、他、調節放出ジャーナル、3,143号（1986年）の公開情報で記載されており、そこでの教訓および開示さ

れたポリマーは、引用文献としてここに組込まれている。

抗原の選択

抗原は細胞、細菌、あるいはウイルス粒子、もしくはその部分から誘導される。ここで定義されたように、抗原はタンパク質、ペプチド、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、核酸、あるいはその組合せから誘導することが出来、それは動物、例えば哺乳類、鳥類、あるいは魚類における免疫原性応答を誘発する。ここで定義されたように、免疫原性応答は体液性あるいは細胞媒介的である。免疫原性応答が指向する材料が抗原性に乏しい場合には、それは例えばいくつか商業的に利用出来る試薬キット

トの一つで標準共有結合手法を使ってアルブミンなどの担体もしくはハプテンに接合することが出来る。

一つの実施例において、核酸が発現される細胞に抗原をコード化する核酸をデリバリするためにポリマーが使用される。

望ましい抗原の例はインフルエンザタンパク質、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）タンパク質、インフルエンザ菌、およびB型肝炎タンパク質、およびグラム陰性細胞壁および淋菌タンパク質などのようなりボ多糖類を含む。

培養時の細胞のウイルス感染は、2種類のウイルス粒子、成熟感染ウイルスおよび核酸を欠くある感染ウイルス状粒子を生成する。ウイルスが細胞培養で高力価で複製する場合には不活性化ウイルス粒子を経口ワクチンに使用することが望ましい。細胞培養で成長することが出来ないか、もしくは腫瘍化するウイルスに対しては、非複製ウイルス状粒子（VLPs）を生産する組換えDNA技術を使用することが出来る。組換え技術を使って、固有の複雑性のため前記2種のアプローチのいずれにも適していないウイルスから、その表面に防護抗原（プソイドタイピング）を展示するウイルス状粒子を構築することが出来る。前記のすべての抗原はウイルス粒子構成成分であるが、防護免疫を引き出す抗原は必ずしもすべてが構成抗原ではない。防護抗原が非構成成分であるような場合には、そのような抗原を自己組立てウイルス状粒子の表面に遺伝子的に融合させることが出来る。

アジュバント

ある実施例では、粘膜あるいは非経口デリバリのためカプセル化された抗原にアジュバントを含めることが望ましい。

経口投与のためのアジュバント

微量のコレラ毒素 (CT) (コレラ毒性サブユニットA、コレラ毒性サブユニットB、あるいはその両方のいずれか) および第2抗原の混合物の経口投与が共同投与抗原に対する粘膜免疫を刺激する。更に抗原のみの経口デリバリにより引き出される免疫寛容性に代る第2抗原に対しての劇的な液性免疫応答が存在する。かくして粘液デリバリCTは粘膜および液性免疫両方の強力な免疫刺激剤あるいはアジュバントとして機能する。このアジュバント作用のメカニズムは、パイエル板の上に乗るドーム細胞 (あるいはM細胞) に特異的に結合し、次いでドーム細胞に通常結合しあるいは結合しない抗原に対する免疫応答性を賦与するようにリンパ球系細胞を変化させるCTの能力によるものである。最近ではこの結合機能はコレラ毒素の非毒性Bサブユニット (CT-B) 分子に局在化してきた。かくして抗原へのCT-Bの追加が同一抗原に対するCTにより引き出される免疫応答を模倣することが示された。従ってしばしば望まれることは、CTをマイクロカプセル化ワクチンに含ませることで経口投与抗原の免疫原性を高めることである。

非経口投与のためのアジュバント

アジュバントの例はムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド、サイトカイン、ジフテリア毒素およびエキソトキシンA

である。商業的に利用出来るアジュバントは、マサチューセッツ、ウォーセスター、ケンブリッジ バイオサイエンシズのQS-21およびリビ イミューノケムのモノホスホリル脂質A (MPLA) を含む。

更にまたここで示されるのは、ポリホスファゼンが経口あるいは非経口投与される際にアジュバント作用を持ち得るということである。特にマイクロスフェアがアルジネート95%およびポリホスファゼン (PCPP) で形成される場合に

その免疫原性を高めることを実施例が示している。

免疫原性組成物の調製

ポリマーは例えば米国特許番号5, 149, 543号、コーエン、他、あるいは米国特許番号4, 352, 883号、リム、他の方法を用い、その教訓はここに組み込まれており、あるいはポリマーおよび抗原の溶液をスプレー乾燥することにより、抗原をカプセル化するのに使用される。代替的には抗原およびアジュバントを含むマイクロスフェアが水溶液成分を単純に混和し、次いで極微粒子を形成するための機械的力でポリマーをある物質と一緒に凝固させることにより調製することが出来る。

ここで使用される「マイクロカプセル」という用語は別途説明のない限り極微粒子、マイクロスフェア、およびマイクロカプセルを包含する。一般に有用なこれらのマイクロカプセルは1乃至200ミクロンの間、望ましくは経口投与のため1乃至15ミクロンの間、また注射用の限定要素は針のサイズである

が注射用として望ましくは1乃至100ミクロンの間の微粒子直径を持つものである。

望ましい実施例でポリホスファゼン／抗原溶液はまず抗原を Na_2CO_3 , 3%の1部に攪拌しながら溶解させ、次いでPCPPを溶解するまで攪拌しながら追加し、またpH7.4のリン酸緩衝液3部をゆっくり加えることで調製された。洗剤Brj 58はポリマー溶液を攪拌しながら最終濃度が0.2%になるように加えられた。PCPPの最終濃度は2.5%である。ナトリウムアルジネート／抗原溶液は適切な量の抗原をイオン除去水に溶解して調製される。アルジネートは次いでアルジネートの最終濃度が1.25%になるように抗原溶液にゆっくり加えられる。絶えず攪拌しポリマーを抗原にゆっくりと加えることは、等質の溶液を得るために必要である。

経口デリバリ用のマイクロスフェアを製造するためのもっとも望ましい例で、マイクロスフェアは、 $150 \mu\text{l} / \text{min}$ の速度でくみ出しポンプを使ってポリマーおよび抗原溶液を噴霧ノズル（カナダ、オッタワ、ターボタック）に送り込むか、もしくは18ゲージ平滑末端針を備えた超音波スプレーノズル（ニューヨ

ーク、ファーミングデール、メドソニック、インコーポレイテッド) に送り込まれて生成される。分散抗原を含むポリマー溶液は次いで空気圧力が平方インチ当たり約35ポンドの下でノズルの1.0mmの穴を通して押し込まれる。ポリホスファゼンとしては、微小液滴はそれがCaCl₂, 7.5%、Brj 58, 0.5%浴にノズルか

ら35cmの所でぶつかる際に架橋する。Brj 58はマイクロスフェアの塊状化を防止するために加えられる。CaCl₂, 1.5%浴(Brj 58のないもの)がアルジネートマイクロスフェアのゲル化のために使用される。マイクロスフェアは次いですばやく遠心分離管に移され、架橋工程を完成し、かつCaCl₂浴で沈殿して起こるマイクロスフェア凝集塊を避けるために約30分間ゆっくり振動させられる。凝集はマイクロスフェア表面にある露出したカルボキシル基の間のCa⁺⁺架橋およびもしくはマイクロスフェア間の疎水相互作用によるものである。30分後、マイクロスフェアは4℃、2800rpm、15分の遠心分離で収集された。上澄みは棄てられ、ペレットは一度に洗浄され無菌イオン除去水で再懸濁された。マイクロスフェアは4℃で分析まで貯蔵された。これらの条件で生成したポリホスファゼンマイクロスフェアの約90%は直径が1から10ミクロンの範囲にあった。

より大きなマイクロスフェアはより大きい吐出口および低い空気圧を用いて作られた。

ポリマー-抗原接合体

ポリマーはまた当業者にとって周知の方法に従って水溶性接合体を創り出すために抗原と共有接合され、通常は抗原側のアミノあるいはカルボキシル基およびポリマー側のイオン化可能側基の一つとの間の共有結合により行われる。

免疫原性組成物の投与

抗原を含むヒドロゲルマイクロスフェアは粘膜あるいは非経口投与することが出来る。粘膜面へのデリバリの必ずしも限定されないルートの例は、鼻腔内(あるいは一般に鼻関連リンパ系組織)、呼吸器系、膣、および直腸である。非経口

デリバリの必ずしも限定されない例は、皮内、皮下、および筋肉内を含む。

抗原は天然に発生するアルジネートおよび合成ポリホスファゼンの両方でカプセル化することが出来る。抗原装荷の水準、放出速度およびマイクロスフェアのサイズ分布は生成する免疫応答を変化させるのに使用される。この用量は後述する実施例で示されるようにポリマー-抗原投与により引き出される抗体の力価にもとづいて、抗原装荷および用量を投与する標準技法さらに各抗原の投与スケジュールにより決定される。

免疫原性ワクチン組成物が、他の薬理許容成分、例えば水、生理食塩水、あるいはDrake oilTM、Mark oilTMのような鉱油およびスクアレンを含み、乳濁液を形成し、あるいは水状緩衝液と併用され、もしくは胃内を通過する際に分解からマイクロカプセルを防護するためにカプセルあるいは腸溶剤皮でカプセル化することが出来ることは当業者により理解されるであろう。

抗原原性組成物の貯蔵

イオン架橋マイクロスフェアはその完全性を保持するために緩衝液に貯蔵される必要がある。ポリマーマトリックス内にとじ込めたマイクロスフェアおよび抗原の完全性を維持するよう

に条件は定められてきた。抗原を含有するマイクロスフェアは無菌イオン除去水で4℃で貯蔵され、7日間安定している。食塩加リン酸緩衝液(PBS)などの標準緩衝液が使用出来ないのは、カルシウムイオンのナトリウムによる置換でマトリックスの液化に導かれるためである。マイクロスフェアをポリLリシンあるいはその他の架橋剤のようなアミノ酸ポリマーで被覆するとPBSで貯蔵することが出来る。

この発明は更に以下の限定されない実施例を引用することでより理解されるであろう。

実施例1：毒性の研究

アルジネートはヒトの消費出来るものとして認められている。ポリホスファゼンは標準の方法を用いて非毒性を示すために検定することができる。ポリホスファゼンは生細胞に対し非毒性であることがこれまで示されてきた。M. C. バ

ーノ、他バイオ／テクノロジー、9巻、468ページ（1991年）で報告されたように、ハイブリドーマ細胞が150から200ミクロンの間の直径を持つポリホスファゼンマイクロスフェアにカプセル化された。カプセル化ハイブリドーマ細胞は細胞分裂を受け、カプセル化の10日後までに、マイクロスフェアは基本的に生細胞で充填された。追加の研究がここで記述される。

第1の研究で細胞培養皿はポリホスファゼンで被覆され、次いでニワトリ胚芽繊維芽細胞が被覆ベトリ皿に接種された。ニワトリ胚芽繊維芽細胞接種3日後細胞は平たくなり紡錘形とな

り、位相差顕微鏡の下で誰でも有糸分裂像を観ることが出来る。これは細胞培養でポリホスファゼンの無害性を示すものであった。

第2の生体内毒性研究ではアルジネートおよびポリホスファゼンの急性毒性が生後6-8週のSDラットで評価された。この研究はグループ当たり5匹のオスラットの4グループよりなる。1晩絶食の後各グループの各動物は胃管栄養を經由してポリマー5000mg/kg（水）の単一経口用量を受けた。用量は20ml/kgであった。1グループの動物は水を受け入れ、対照グループとして役立たせた。2グループの動物はアルジネートマイクロスフェアを受けた。3グループのラットはポリLリシンM.W. 68,000で被覆されたアルジネートマイクロスフェアを受けた。4グループの動物はポリ[ジ（カルボキシルアトフェノキシ）ホスファゼン]マイクロスフェアを受けた。動物は7日間臨床観察された。体重が免疫前第1日、および安楽死の時に記録された。血液サンプルが安楽死の際CO₂による麻酔後眼窩後血流洞の穿刺により得られた。動物は血液収集の前に一晩絶食された。組織は剖検で検討され保存された。

マイクロスフェアを受けたラットと対照グループのラットの間には体重の増加に著しい差異は見られなかった。血液学および臨床化学の結果は各グループのすべてのラットについて正常であった。剖検のいずれかの器官でも観察された異常性に関連する処置は存在しなかった。この研究は5000mg/kgの経口用量でポリホスファゼンおよびアルジネートマイクロス

フェアが急性毒性ではないことを示した。

実施例2：タンパク質のとり込みおよびマイクロフェアの放出特性

免疫応答を引き出すマイクロカプセル化抗原のために、抗原はマイクロフェアから放出されねばならない。抗原は2種の異なったしかし相互に排他的でない拡散と侵食という過程を通じてマイクロフェアから放出される。もしヒドロゲルが分散抗原を透過出来るなら、マイクロフェアとマトリックスを充填する水相に続いて、抗原はマイクロフェアから単純に拡散出来る。従って、抗原の放出は抗原に対するマイクロフェアマトリックスの透過性の指標である。逆にポリマーマトリックスに対する抗原の吸着は、マイクロフェアからの抗原の拡散を減少するかもしくは除去するのに役立つであろう。

放出速度の特性付け

タンパク質分子量マーカー（エイマーシャム）およびFITC標識ウシ血清アルブミン（シグマ）が溶解性タンパク質の放出速度を研究するためにマイクロカプセル化された。20nmポリスチレンビード（デュークサイエンティフィック）の放出速度が比較の目的で使用する事が出来る。

マイクロフェア内のタンパク質の定量

免疫原性研究のために、マイクロフェア内のタンパク質量

がとり込みパーセントを評価するためのマイクロフェア創出直後に、また既知の抗原量のデリバリを確かめるための動物への注射直前にいずれも直接測定される。

マイクロフェアのタンパク質量はバイオーラッドタンパク質検定等の標準検定では評価出来ない。タンパク質はヒドロゲルを検出する原因となる Ca^{++} をキレート化してマイクロフェアから放出することが出来るが、2価の陽イオンを含むバイオーラッド試薬の追加はポリマーを再架橋させ抗原を染料試薬に対し利用出来なくさせる原因となり得る。

イオン架橋マイクロフェアにカプセル化されたタンパク質抗原の定量は、SDS-PAGE内の無傷マイクロフェアの既知の量を電気泳動させて測定される。電気泳動の間に、タンパク質はマイクロフェアマトリックスから移動しポリ

アクリルアミドゲルに入る。タンパク質濃度はマイクロスフェア標本に対し平行して電気泳動するカプセル化タンパク質の既知の量と比較することにより測定される。

マイクロスフェアのサイズの測定

1乃至15ミクロンのマイクロスフェアがアジュバント作用を持つものと考えられ、従って望ましいものである。アルジネートおよびポリホスファゼンマイクロスフェアのサイズはコールターLS100微粒子寸法測定器で測定される。このサイズは1乃至10ミクロンのサイズの%数字として報告されている。

ポリホスファゼンマイクロスフェアからの抗原放出の修飾

—

ポリマー濃度および抗原分子量の作用

ポリ〔ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン〕の透過性がポリアクリルアミドゲル電気泳動に普通使用される14,000乃至200,000ダルトンの分子量にわたるタンパク質分子重量マーカー(レインボー¹、タンパク質分子重量マーカー(エイマーシャムコーポレーション))のカプセル化により調査された。タンパク質の放出は上澄みの分光光度測定により検定された。

この結果は図1で示される。14.3キロダルトン分子量のリゾチームのような特定のタンパク質の透過性はゲルの中にあるポリマーの濃度により影響を受ける。ポリマー濃度が1.5%から3.3%に上昇するにつれて、マイクロカプセルマトリックスからのタンパク質の拡散は著しく減少する。同様にタンパク質の分子量が増加するにつれて、マトリックスからのタンパク質の拡散は遅延する。例えば200キロダルトン分子量のミオグロビンタンパク質は3.3%のポリホスファゼンマトリックスから24時間以内に拡散出来なかった。

ポリマー分子量および組成物の作用

抗原がマイクロスフェアから放出される第2のメカニズムはマイクロスフェアを構成するポリマーマトリックスの侵食を通じてである。侵食はゲル化反応の逆転を通じて発生し、ポリマー

分子の可溶化および周囲の水状環境へのその回帰に帰着する。ポリホスファゼンマイクロスフェアの分解は生理食塩水溶液 (pH 7.4) で質量損失、ポリマーマトリックスの分子量および溶解物の形成をモニターすることにより研究された。各種分子量のPCPPマイクロスフェアにとっての侵食プロファイルは図2で示される。溶液内で高分子量のPCPPマイクロスフェアを20日保温し、また更に180日間に延長したが検出出来る質量損失は観察されなかった。しかし同じ期間でGPCデータはポリマー分子量の著しい減少を示している (図3a)。分解のメカニズムは明らかに分子内カルボキシル基触媒作用を含むことが出来る。マイクロスフェア調製のために低分子量のPCPPを使用すると、最初の10日間でヒドロゲルの著しい侵食およびポリマー分子量の減少に導かれる (図3b)。マトリックスにあるのと事実上同じ分子量の水溶性ポリマー産物が検出された。

このシステムでマトリックスから溶液へのポリホスファゼンの放出で約200キロダルトンの分子量閾値が存在することをこれらのデータは示している。しかしポリマーの溶解度はマトリックスで支持されるカルシウムイオン (あるいは他の多価陽イオンもしくはポリマー) の量および高分子の電離度に依存する。PCPPの侵食で観察される差異は抗原デリバリシステムにとってはもっとも重要なものである。

ポリホスファゼンは加水分解度を含め調節可能な諸物性を提供出来る適切な側基をとり込むことにより効果的にあつらえることが出来る。グリシナート基などの加水分解感受性ペンダン

ト基の導入は水状架橋の下で分解速度を増加させる。ヒドロキシ誘導体を産出するためにこれらのアミノホスファゼンの中性培地に現れる外部P-N結合の切断が、ポリマーに加水分解不安定性を付与する。

グリシナート基の10%を含むポリ [ジ (カルボキシルアトフェノキシ) ホスファゼン-コ-ジ (グリシナート) ホスファゼン] (PC-G1PP) がマイクロスフェアの調製および分解の研究に使用された。これらのポリマーヒドロゲルの侵食割合はまたポリホスファゼンの分子量に依存する。重量平均分子量130

キロダルトンのPC-GIPPは、図2で示されるように、3日以内に質量損失が100%になる。図4におけるマトリックスおよび溶解物のGPC分析は、水状環境で240日間保温するとポリマーバックボーンが分解して1キロダルトン以下の分子量を持つ断片および無機リン酸塩になることを示している。高分子電解複合膜を産出するためにヒドロゲルマイクロスフェアをポリLリシン（分子量62キロダルトン）で被覆すると、侵食率は2.5倍も著しく減少するが、これは立体障害がポリホスファゼンマイクロスフェアの分解性および安定性を調節する追加のアプローチを明らかに提供するためである。

架橋剤の作用

マイクロスフェアからの抗原放出を調節出来る第3の手段は、マイクロスフェアの外側に半透過性膜を形成するポリLリシンあるいは類似の多価イオンを用いてポリホスファゼンマイク

ロスフェアを被覆することによる。マイクロスフェアコアは次いでEDTAなどのようなキレート剤の追加により液化されるが、キレート剤はゲル化工程を逆転させポリホスファゼンマトリックスの可溶性を生み出す。透過性の度合いは被覆工程で使用する多価イオンのサイズにより調節出来る。12乃至295キロダルトンの分子量にわたるポリLリシンで架橋したマイクロスフェアからの放出パーセントが図5で示される。ポリLリシンの分子量が増加するにつれて、被覆の透過性は増加し、その結果マイクロスフェアからのポリスチレンビード20nmの放出が増加した。

ポリホスファゼン濃度を変化させ、ポリマーの側基を変更したマイクロスフェアをポリLリシンで被覆する能力は、マイクロスフェアが拍動性およびもしくは持続性放出速度で抗原を放出するマイクロスフェアを形成することを可能にする。ゲル化およびマイクロスフェア形成のための非常に穏やかな条件を組合わせたこのポリマーシステムの操作可能性により、抗体および免疫応答を誘導する単一用量ワクチンを開発するためにはこのポリマーシステムが特に望ましいものとなる。

実施例3：試験管内および生体内免疫応答研究で測定されるマウスに経口投与さ

れるアルジネートにカプセル化されたインフルエンザワクチンの効力

マイクロカプセル化抗原は経口ルートによるマウスの免疫化に使用された。免疫応答の速度は、まず液性免疫の試験管検定により測定された。生体内研究の使用は、抗体クラスの切替え

を実施する能力、免疫応答の速さ、大きさおよび持続時間についての免疫化の用量およびルートの効果、また免疫応答にブースターをかける必要性などの決定を可能にする。下記に示されるようにE L I S A (エリザ) が全抗原特異的応答、また同じくI g G 応答のサブクラスを評価するために使用された。C T L 検定は細胞媒介応答を評価するために行うことができた。

下記で詳細に述べるように、破傷風トキソイド(コンノートラボラトリーズ)およびインフルエンザウイルスが免疫原性研究用としてカプセル化された。マイクロカプセル化抗原は前記の通り調製され定量された。S D S - P A G E により測定されたアルジネートおよびポリホスファゼン内の抗原濃度は投与の前に無菌イオン除去水で調節された。

生後7乃至8週間のメスB A L B / c マウスが無作為に5個のグループに分けられた。f l u 抗原30マイクログラムが挿管法により口径投与された。血液サンプルはC O₂麻酔マウスの眼窩後血脈洞から採取された。マウスは吸入室でC O₂を使って安楽死させた。

ノヴァク他、ワクチン、11巻、55-60ページ(1992年)により展開されたインフルエンザマウス疾病モデルシステムは、マイクロカプセル化インフルエンザを用いる免疫化によりもたらされる防護を研究するのに用いることが出来た。マウスは免疫後のいくつかの時間で誘発試験が行われ、各種器官のウイルス複製水準が測定された。これまでの研究では非経口免疫は鼻および気管を完全に防護しなかったが、それは肺にお

けるウイルス増殖を完全に防護する。かくしてワクチン効力は肺におけるウイルス複製水準を基礎にして評価することが出来る。

インフルエンザは標準方法に従って卵で成長し、タンパク質、血球凝集および

ブランクの各検定により定量された。インフルエンザはホルムアルデヒド溶液 3 % の追加により最終濃度 1 : 4 0 0 0 でホルマリン不活性化された。ウイルス感染性もまた ^{60}Co 源から 1.2×10^4 ラドのガンマ線照射に被曝させて不活性化された。

マウス血清の抗インフルエンザ特異的抗体が pH 9.6 の炭酸ナトリウム緩衝液の中でインフルエンザ感染 M D C K 細胞培養液 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ で被覆された 96 ウエルマイクロタイプレートでエリザにより測定された。被覆および洗浄後タンパク質の非特異的結合に利用出来る部位は、PBS 溶液内に BSA 2.5 % を加えることで遮断された。遮断および洗浄の後 BSA / PBS 1 % 内で血清の 2 倍連続希釈液がウエルに加えられた。未結合血清は洗浄除去され、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG が加えられた。未結合接合体は洗浄除去され、血清抗体は基質 0-フェニレンジアミンジヒドロクロライドを加えて検出された。反応は H_2SO_4 2 M の追加で停止し、吸光度は 490 nm で読み取られた。終点力価は同じ希釈の抗体負のサンプルのそれよりも著しく大きいシグナルを生産する最大のサンプルの逆数である。エリザ反応性インフルエンザ特異的抗体の T g G イソタイプは抗原に結合するマウス抗体の検出で測定された。マウス IgG サブクラス

ス 1, 2 a, 2 b および 3 に特異的なホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヒッジ抗マウス抗体がエリザプレートにある抗原と結合するマウス抗体で反応された。

インフルエンザ血球凝集阻止抗体検定が、非特異的阻害剤を除去するためにニワトリ赤血球 10 % で 30 分保温された熱不活性マウス血清を使って行われた。血清の 2 倍希釈液が 96 ウエルマイクロタイプレートに加えられ、同量のウイルス懸濁液 8 H A 単位が各ウエルに追加され、室温で 30 分保温された。ニワトリ赤血球 0.5 % 懸濁液が各ウエルに加えられ、室温で 45 - 60 分保温された。H I 力価は赤血球の血球凝集を完全に阻害する最大希釈の逆数である。

研究の第 1 グループでは、グループ当り 2 匹のマウスよりなる B A L B / c マウスの 5 個のグループが、無菌イオン除去水 (グループ I)、空のアルジネート

マイクロスフェア（グループ I I）、インフルエンザ 30 μ g を含むアルジネートマイクロスフェア（グループ I I I）、インフルエンザ 30 μ g プラス コレラ毒素（C T）10 μ g を混合して含むアルジネートマイクロスフェア（グループ I V）、あるいは溶解性インフルエンザ 30 μ g（グループ V）で経口挿管により免疫された。血液および糞のサンプルが免疫後 7 日、14 日、21 日および 28 日に収集され、インフルエンザ抗体反応性のクラス特異性が測定された。

動物はアルジネートにマイクロカプセル化されたインフルエンザ単独もしくはコレラ毒素と併用して前記の通り免疫化された。

アルジネートマイクロカプセル化インフルエンザ抗原の結果は図 6 a, 6 b および 6 c で示される。インフルエンザ抗原を受けなかった対照マウス（グループ I および I I）は f l u 特異的血清 I g M あるいは I g G 応答を示さなかった。溶解性インフルエンザ（グループ V）は 7 日に低い I g M 力価を誘導し、それは少なくとも 14 日まで維持されたが、図 6 で示されるように I g G 応答は検出されなかった。カプセル化 f l u および C T は図 6 b で示されるように免疫後 14 日に高水準の f l u 特異的 I g G を誘導した。これらの水準は 28 日まで維持された。アルジネートマイクロカプセル f l u の単独のものは、図 6 c で示されるように、マイクロスフェアインフルエンザ-C T 混合物を受けた動物で見られたものと同じ f l u 特異的 I g G 力価を誘導した。良好な抗体力価は 14 日より早い時期に観察され、高力価の I g G は少なくとも 77 日間存続した。

アルジネートカプセル化インフルエンザおよびコレラ毒素で免疫化された動物は最初の免疫化から 35 日後にブースター投与された。その結果は図 7 に示される。コレラ毒素と併用されるインフルエンザのブースター投与は糞サンプルで測定されるように I g A の生産を誘導する。

要約すると、アルジネートカプセル化 f l u は血清内の I g M および I g G に特異的な抗原の導入に粘膜アジュバンド C T を必要としなかった。アルジネートカプセル化インフルエンザで得られたデータは、C T のない単一経口用量が高い f l u 特異的血清 I g G 応答を誘導することを示す。図 7 に

ける結果は、I g A 抗体がC Tのあるアルジネートカプセル化されたインフルエンザによる単一経口ブースター投与で誘導されることを示す。

実施例4：試験管内および生体内免疫応答研究で測定されるマウスへのポリホスファゼンカプセル化インフルエンザワクチンの経口投与による抗体の生産

前記の通りポリホスファゼンマイクロスフェアでカプセル化されたインフルエンザ単独もしくはコレラ毒素と併用した動物免疫化と同じ実験記録が続けられた。

この結果は図8で示される。コレラ毒素がない場合、血清あるいは糞のいずれかにも抗インフルエンザ抗体の測定可能な生産は少し遅れたもののアルジネートカプセル化抗原（図6b）で示されたものと同じ様式でI g Mの生産が存在する。

実施例5：マイクロカプセル化破傷風トキソイドを用いるマウスの鼻腔内免疫化
マウスは4グループにわけられ、（1）水中の破傷風トキソイド（9動物）、（2）アルジネートマイクロスフェアの破傷風トキソイド、（9動物）、（3）PCPPマイクロスフェアの破傷風トキソイド（10動物）、および（4）アルジネート95%／PCPP5%よりなるマイクロスフェアの破傷風トキソイド（9動物）が鼻腔内に接種された。それぞれの場合において抗原50 μ gが投与された。マウスはエリザで2週後（血清）および3週後（気管支および鼻洗浄）抗体生産を検定され

た。結果は表1で示される。

ポリホスファゼンあるいはアルジネート／ポリホスファゼンマイクロスフェアの抗原鼻腔内投与が血清I g G応答を誘導することを明確に示している。更に抗原がアルジネートおよびPCPPの組合せでカプセル化される場合に、この投与方法がI g A分子の生産を誘導するのに使用出来ることをこの結果が示している。

表 1 : マイクロカプセル化破傷風トキソイドの鼻腔内接種

グループ/動物 処置 破傷風トキソイド力価 (l o g 2)

		l g G	I g A
1	破傷風トキソイド	<256 (<8)	
2	破傷風トキソイド	<256 (<8)	
3	破傷風トキソイド	<256 (<8)	
4	破傷風トキソイド	<256 (<8)	
5	破傷風トキソイド	<256 (<8)	
6	破傷風トキソイド	256 (8)	
7	破傷風トキソイド	256 (8)	
8	破傷風トキソイド	<256 (<8)	
9	破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 0	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 1	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 2	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 3	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 4	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	

1 5	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 6	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 7	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 8	アルジネートマイクロスフェア破傷風トキソイド	<256 (<8)	
1 9	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	512 (9)	<2 (<1)
2 0	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	2048 (11)	<2 (<1)
2 1	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	512 (9)	<2 (<1)
2 2	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	512 (9)	
2 3	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	2048 (11)	
2 4	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	512 (9)	
2 5	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	1024 (10)	
2 6	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	1024 (10)	
2 7	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	1024 (10)	
2 8	PCPPマイクロスフェア破傷風トキソイド	512 (9)	
2 9	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	4096 (12)	8 (3)
3 0	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	4096 (12)	32 (5)
3 1	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	512 (9)	8 (3)
3 2	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	256 (<8)	
3 3	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	2048 (11)	
3 4	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	2048 (11)	
3 5	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	2048 (11)	
3 6	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	2048 (11)	
3 7	アルジネート/PCPP5%マイクロスフェア破傷風トキソイド	1024 (10)	

実施例6：マイクロスフェアカプセル化破傷風トキソイドによ

るマウスの非経口免疫化および従来型アジュバンドによる免疫化との

比較

伝統的に大抵の注射用非複製ワクチンは防護するのに十分な血清抗体力価を達成するために多重用量を必要とした。明らかな理由でもって単一接種で防護を達成することがより望まれる。従って抗原の免疫原性に対するポリホスファゼンの作用は単一用量で皮下免疫されたマウスで検証された。水、ミョウバンおよび完全フロイントアジュバンド処方の抗原がコンバラトルとして多くの実験に含まれた。

アルジネートあるいはポリホスファゼンよりなるポリマーマイクロスフェアで処方された破傷風トキソイド抗原の免疫原性が、溶解性破傷風トキソイドおよび標準アジュバンドであるミョウバンおよび完全フロイントアジュバンド (CFA) の破傷風トキソイドと比較された。5匹のマウスのグループが破傷風トキソイド $20 \mu\text{g}$ で皮下ルートを用いて免疫化された。

この結果は表2で示される。抗破傷風トキソイド血清免疫応答はエリザで検定された。溶解性破傷風トキソイド抗原およびアルジネートマイクロカプセル化破傷風トキソイドは13週で512の最大力価を誘導した。破傷風トキソイドを含むポリホスファゼンマイクロスフェアはミョウバンあるいは完全フロイントアジュバント破傷風トキソイドよりも免疫後より早い時期により高い抗体力価を誘導した。更に破傷風トキソイドを含むポリホスファゼンマイクロスフェアは免疫後13週でもまだ上昇を続ける抗体力価を誘導した。このおそい時点において、ポリホスファゼンマイクロスフェア破傷風トキソイドは

65, 536の力価を誘導し、これは溶解性破傷風トキソイドでみられる応答よりも約100倍強力であり、ミョウバンおよび完全フロイントアジュバントでみられるものと同じ位あるいは少し上まわる(2乃至4倍)ものであった。ポリホスファゼンマイクロスフェアは破傷風トキソイドに対する抗体の誘導でアルジネートマイクロスフェアよりも明らかに優れていた。

表 2 : 破傷風トキソイド皮下接種マウスのエリザ力価

抗破傷風トキソイドエリザ力価					
	3週	5週	7週	9週	13週
水溶解破傷風トキソイド	<256	256	256	256	512
アルジネートマイクロスフェア 破傷風トキソイド	256	512	512	512	512
ミョウバン破傷風トキソイド	2048	8192	16384	32768	32768
完全フロイントアジュバント 破傷風トキソイド	2048	16384	16384	32768	16384
ポリホスファゼンマイクロスフェア 破傷風トキソイド	8192	16384	32768	32768	65536

破傷風トキソイドによる免疫化の用量依存効果がポリホスファゼンマイクロスフェアあるいは完全フロイントアジュバントで処方された破傷風トキソイドの量を変更してマウスを免疫化することにより検証された。

この結果は表 3 で示される。ポリホスファゼンマイクロスフェア破傷風トキソイドの免疫原性は完全フロイントアジュバント処方破傷風トキソイドに比べて非常に有利であった。すべての時点およびすべての破傷風トキソイド用量において、2 種の処方のエリザ力価はお互いの 2 倍の希釈度内にあった。

表 3 : 破傷風トキソイド皮下接種マウスのエリザ力価

抗破傷風トキソイドエリザ力価

破傷風トキソイド+ポリホスファゼン

破傷風 トキソイド	3 週	5 週	7 週	9 週
25	32768	65536	131072	131072
5	8192	32768	65536	65536
2.5				
1	4096	16384	65536	65536
0.2	2048	4096	8192	8192
0.04	<256	<256	256	256

破傷風トキソイド+完全フロイントアジュバント

破傷風 トキソイド	3 週	5 週	7 週	9 週
25	16384	131072	262144	262144
5				
2.5	4096	16384	32768	16384
1	16384	32768	32768	32768
0.2	1024	4096	4096	4096
0.04	<256	<256	<256	<256

実施例 7 : ポリマーマイクロスフェアにあるいはアジュバントで処方されたインフルエンザ微粒子による非経口

免疫化

マウスは更にポリマーマイクロスフェア、ミョウバンおよび完全フロイントアジュバントに処方されたホルマリン不活性化インフルエンザウイルス $5 \mu\text{g}$ で免疫化されたが、これはその処方の相対効率が破傷風トキソイドに対するものと比べて外膜ウイルスに対するものと同じであるかどうかを測定するためであった。

この結果は表 4 で示される。再度ポリホスファゼンマイクロスフェアは非常に高い力価抗 f l u 免疫応答を誘導することでは完全フロイントアジュバントと同じ位効率的であり、水、ミョウバンあるいはアルジネートマイクロスフェアよりもずっと効率的であった。破傷風トキソイドの結果とは対照的に、ミョウバンア

ジュバントのインフルエンザはかなり低い力価抗 f l u 応答を誘導する水溶性インフルエンザおよびアルジネートマイクロカプセル化インフルエンザと同様に低かった。これをまとめると、抗原を含むポリホスファゼンマイクロスフェアは完全フロイントアジュバント処方抗原と同じ大きさの抗体応答を誘発することをこの結果が示している。

表 4 : x - 3 1 インフルエンザ皮下接種マウスのエリザ力価

抗 f l u エリザ力価

	3週	5週	7週	9週	13週
水溶解flu	256	1024	1024	512	512
アルジネート MS flu	512	1024	2048	2048	2048
ミョウバンflu	<256	512	1024	2048	2048
完全アジュバントflu	8192	16384	32768	32768	16384
ポリホスファゼン MS flu	8192	32768	32768	8192	16384

マウス血清は血球凝集阻止および中和検定により機能抗体の存在を検証された。血球凝集阻止検定は表 5 で示される。H A I 検定で測定されたように、f l u を含むポリホスファゼンマイクロスフェアは 7 週で 1 2 8 0 の抗体力価を誘発し、一方ミョウバンおよびアルジネートマイクロスフェアの f l u と同じく完全フロイントアジュバントの f l u は H A I 力価を検出出来ずあるいは誘発しても非常に低い力価であった。

表5 : x - 3 1 インフルエンザ皮下接種マウスの
血球凝集阻止検定

	H A I 力価				
	3週	5週	7週	9週	13週
水溶解flu	微量	微量	微量	40	微量
アルジネート MS flu	微量	微量	40	40	40
ミョウバンflu	微量	微量	微量	微量	微量
完全フロイントアジュバントflu	微量	微量	微量	40	微量
ポリホスファゼン MS flu	320	640	1280	1280	1280
水*	微量	微量	微量	微量	微量

* 負の対照は非特異的血清血球凝集阻止因子であるため20の力価であった。

微量 \leq 20

インフルエンザ感染性を中和する抗体は50%ブランク減数検定で検定された。ポリホスファゼンマイクロスフェアのfluは13週までに800の検出力価を誘導したが、水溶解および完全フロイントアジュバントのfluは検出可能中和抗体力価を誘導しなかった。H A I および中和検定はインフルエンザにとっては感受性機能抗体検定である。かくしてポリホスファゼンマイクロスフェアにより産み出される免疫応答は完全フロイントアジュバントより優れている。

表6 : インフルエンザブランク減数検定

	13週
ポリホスファゼンMSのflu	800
水溶解性flu	<200
完全フロイントアジュバントflu	<200
正常なマウス血清	<200

これらの処方により誘導されるI g G イソタイプはエリザ検定で測定された。結果は表7で示される。ミョウバンアジュバントのインフルエンザは予期した通り単にI g G 1 応答を誘導した。完全フロイントアジュバントで処方されたfluは主としてI g G 1 応答を誘導し、それは7週でピークを迎え13週までに衰退していった。アルジネートおよびポリホスファゼンマイクロスフェア処方のf

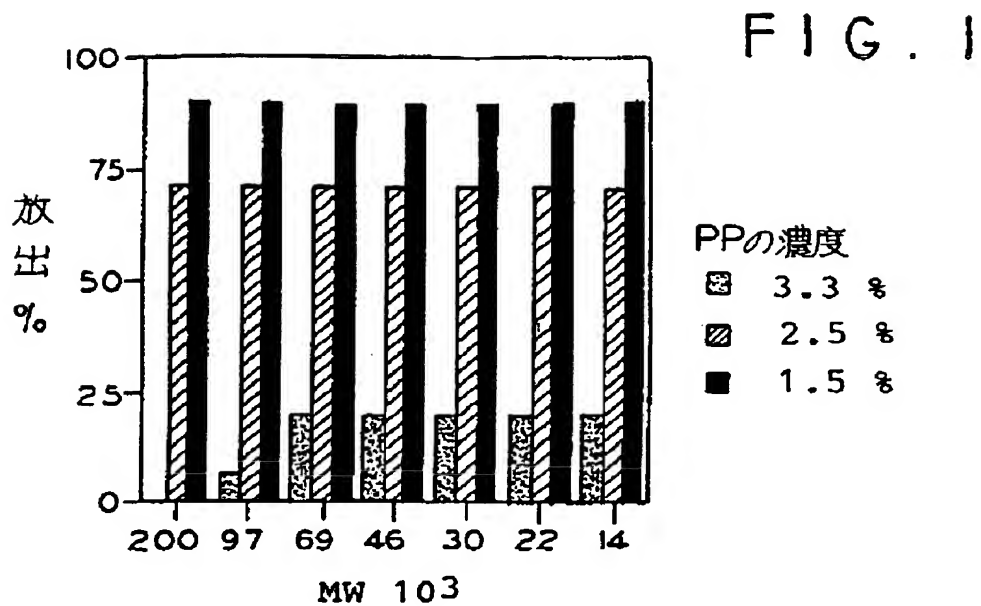
I u は同じく主として I g G 1 応答を誘導し、それは7週までにミョウバン処方の f l u よりも高い値であった。更にポリホスファゼンマイクロスフェア処方抗原は、完全アジュバント処方抗原により誘導される力価に比べて非常に有利な力価を誘導した。完全フロイントアジュバントと同じように、ポリホスファゼンマイクロスフェアはかなりの水準の I g G 2 a および I g G 2 b 抗体を誘発した。I g G 3 イソタイプで検出される活性水準で免疫応答での著しい差異が見出された。ポリホスファゼンマイクロスフェアは有意の I g G 3 抗体力価を誘導することの出来る唯一の処方であった。

表 7 : f l u エリザによるイソタプ化の結果

	3 週 間						7 週 間				1 3 週 間		
	I g G 1	I g G 2 A	I g G 2 B	I g G 3	I g G 1	I g G 3	I g G 2 A	I g G 2 B	I g G 3	I g G 1	I g G 2 A	I g G 2 B	I g G 3
アルジネート M S f l u	1024	<256	256	<256	65536		1024	512	<256	8192	512	<256	<256
P P P M S f l u	8192	4096	512	512	131072		16384	1024	4096	16384	16384	2048	1024
ミョウバン f l u	512	<256	<256	<256	16384		<256	<256	<256	8192	<256	<256	<256
完全フロイントアジュバント f l u	8192	1024	4096	<256	>52428		8192	4096	<256	32768	2048	2048	<256
水溶性 f l u	256	512	256	<256	2048		1024	256	<256	1024	512	<256	<256

ポリマーアジュバントおよび合成法更にワクチン組成物への使用に関するこの発明の修飾および変更は、前記の詳細な説明から当業者にとっては明らかであろう。このような修飾および変更は付記する特許請求の範囲内にあるように意図されている。

【 図 1 】



【 図 2 】

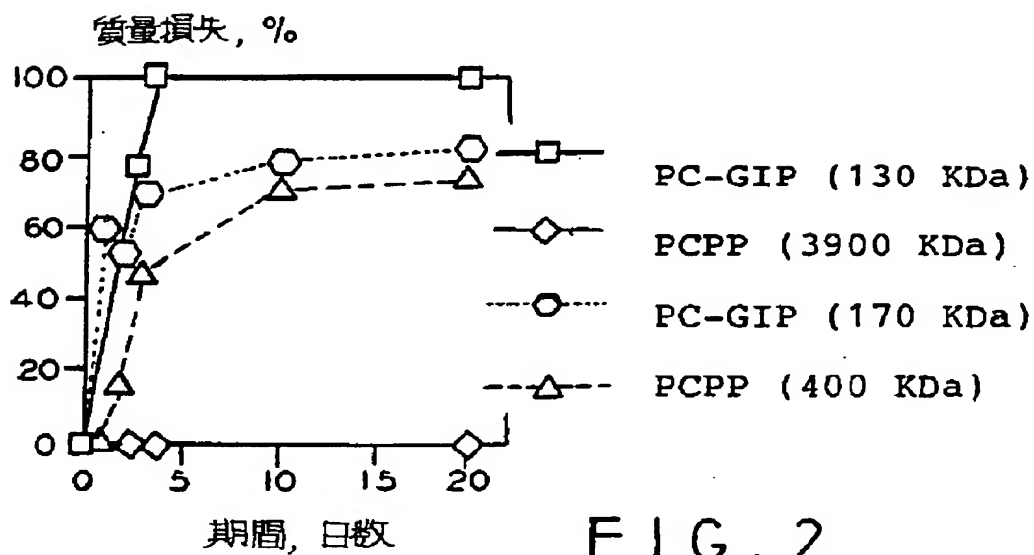


FIG. 2

ポリホスファゼン マイクロスフェアの
侵食プロフィール

【 図 3 】

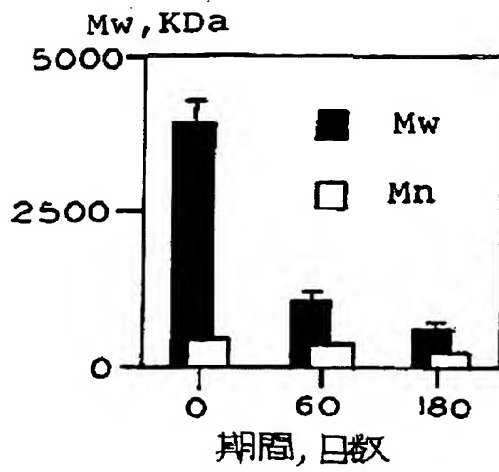


FIG. 3A

異なる出発分子量のポリホスファゼンによるPCPPヒドロゲルの分子量分解プロフィール

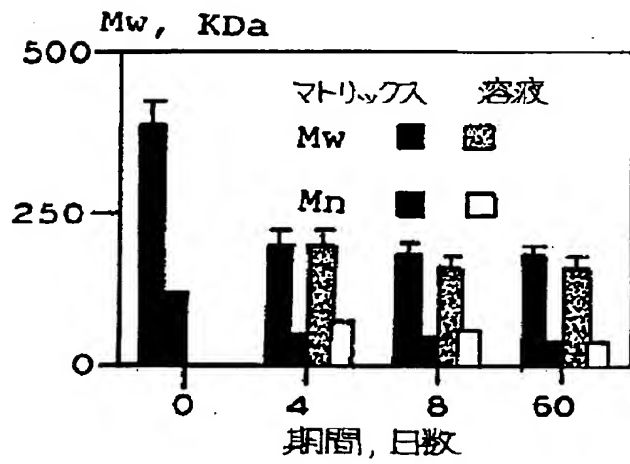
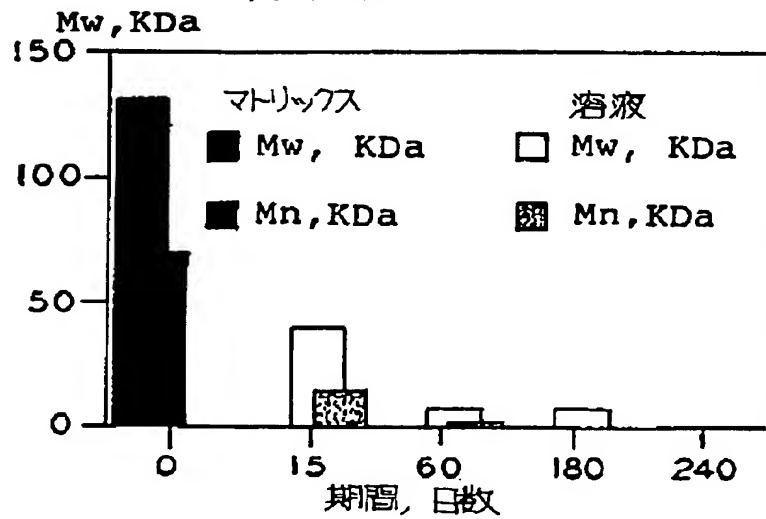


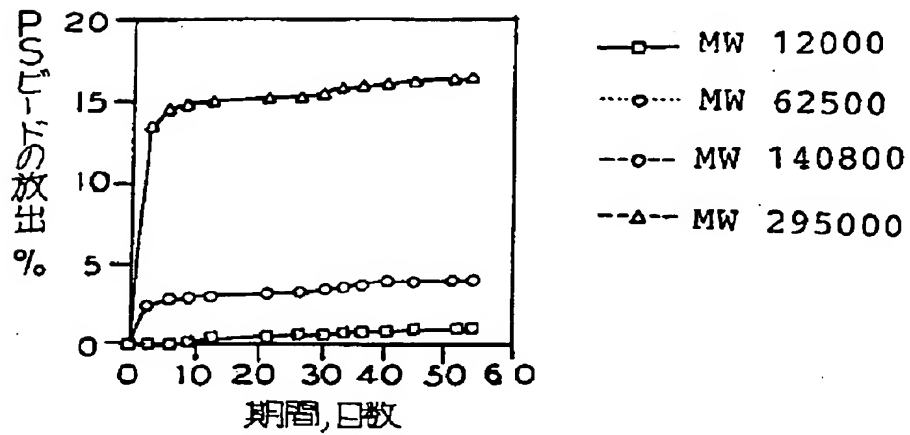
FIG. 3B

【 図 4 】

FIG. 4 PC-G1PPヒドロゲルの分子量分解
プロファイル

【 図 5 】

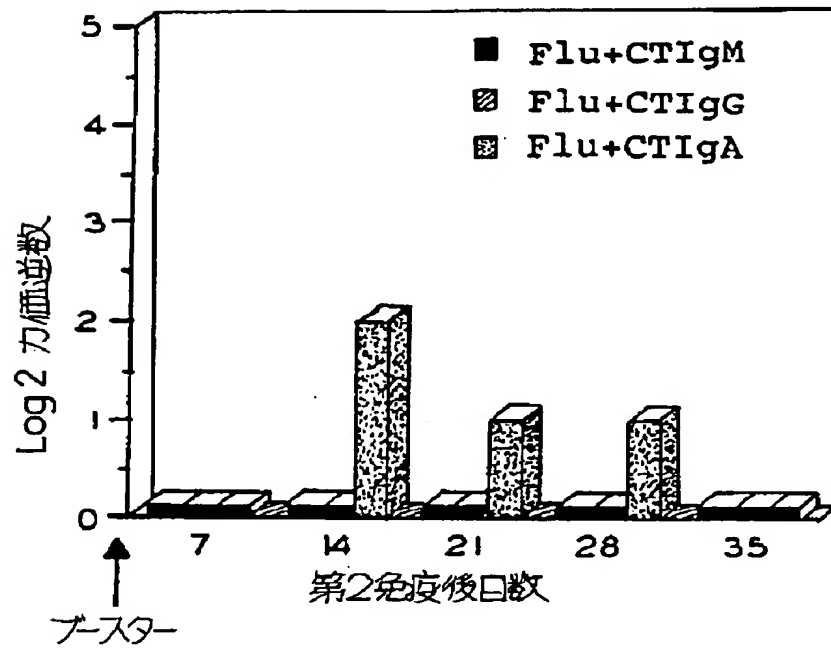
FIG. 5



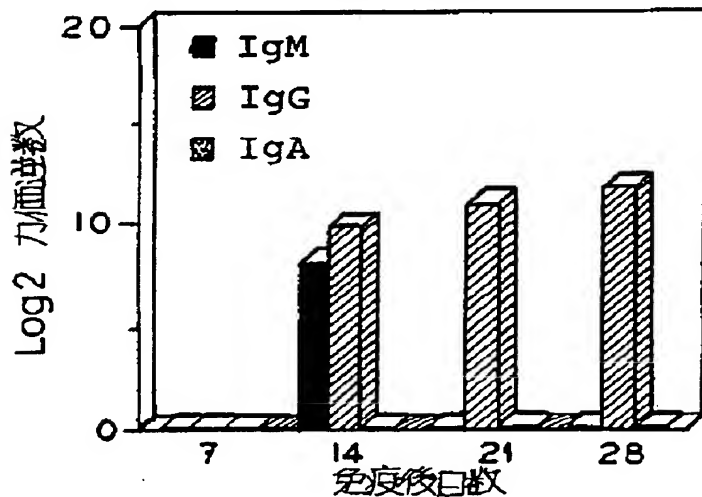
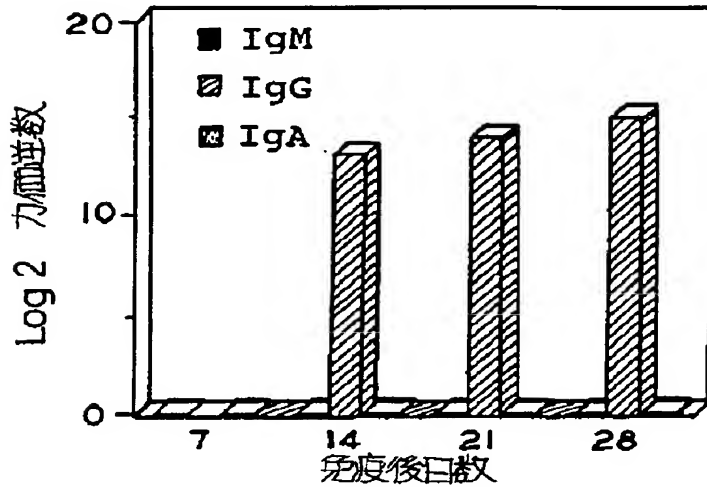
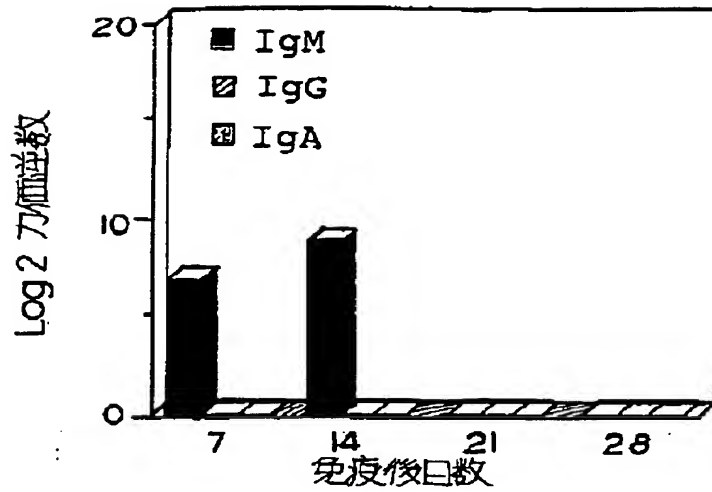
【 図 7 】

FIG. 7

黄サンプル(アルジネート+CT)のflu特異的
抗体応答



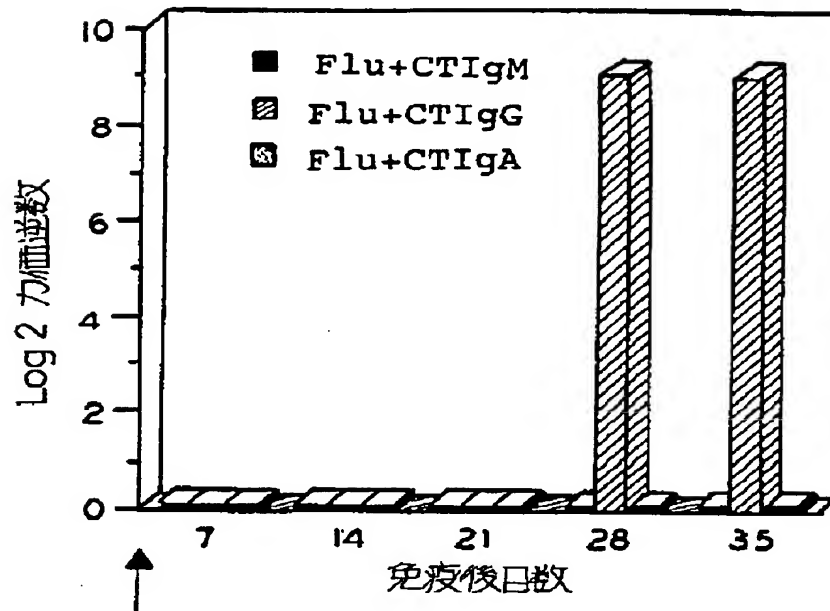
【 図 6 】



【 図 8 】

FIG. 8

血清 (PPP+CT) の flu 特異的抗体応答



【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/07749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(5) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,880,622 (ALLCOCK ET AL) 14 November 1989, abstract, col. 1, lines 6-12, col. 2, lines 17-28, col. 2, line 45 to col. 3, line 48, col. 4, lines 3-55, col. 5, lines 48-70, cols. 8 and 9, col. 4, lines 55-65, claims.	1-38
Y	US, A, 5,149,543 (COHEN ET AL) 22 September 1992, abstract, col. 1, lines 13-64, col. 5, lines 50-65, col. 6, lines 10-60, col. 3, line 63 to col. 4, line 19, col. 4, lines 22-48, col. 5, lines 6-15.	1-38
Y	Vaccine, Volume 10, issued 1992, I. Esparza et al, "Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid", pages 714-720, especially abstract, page 716.	1-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "E" earlier document published on or after the international filing date "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "L" documents which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "A" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 03 OCTOBER 1994		Date of mailing of the international search report 24 OCT 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer NITA M. MINNIFIELD Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/U394/07749

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Molecular Immunology, Volume 28, No. 3, issued 1991, J. H. Eldridge et al, "Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system", pages 287-294, especially abstract, page 288.	1-38
Y	Journal of Controlled Release, Volume 11, issued 1990, J. H. Eldridge et al, "Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches", pages 205-214, see entire document.	1-38
Y	Science, Volume 249, issued 28 September 1990, R. Langer, "New methods of drug delivery", pages 1527-1533, see entire document.	1-38
Y	EP, A, 0,420,459 (HUANG ET AL) 03 MARCH 1991, see entire document.	1-38
Y,P	International Journal of Technology Assessment in Health Care, Volume 1, issued 1994, S. Cohen et al, "Novel approaches to controlled-release antigen delivery", pages 121-130, see entire document.	1-38
A	Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 1, issued, 1987, D. L. Wise et al, "Opportunities and challenges in the design of implantable biodegradable polymeric systems for the delivery of antimicrobial agents and vaccines", pages 19-39, see entire document.	1-38
Y	Vaccine, Volume 11, No. 2, issued 1993, R. H. Reid et al, "Preclinical evaluation of microencapsulated CFA/II oral vaccine against enterotoxigenic <i>E. coli</i> ", pages 159-167, see entire document.	1-38
Y,P	Vaccine, Volume 12, No. 1, issued 1994, W. Morris et al, "Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation", pages 5-11, see entire document.	1-38
Y	Journal of Infectious Diseases, Volume 167, issued 1993, Z. Moldoveanu et al, "Oral immunization with influenza virus in biodegradable microspheres", pages 84-90, see entire document.	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US94/07749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (5):

A61K 39/00, 39/38, 39/21, 39/29, 39/145, 39/165, 39/15, 39/13, 39/20, 39/25, 39/245, 39/05, 39/08, 39/095, 31/74

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

424/184.1, 78.08, 249.1, 189.1, 188.1, 209.1, 210.1, 226.1, 227.1, 208.1, 212.1, 215.1, 217.1, 219.1, 231.1, 230.1, 245.1, 247.1

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

424/184.1, 78.08, 249.1, 189.1, 188.1, 209.1, 210.1, 226.1, 227.1, 208.1, 212.1, 215.1, 217.1, 219.1, 231.1, 230.1, 245.1, 247.1

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, CA, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE,

search terms: author/inventor search, vaccine, encapsulation, hydrogels, microencapsulation, orally, polymer, immunization, gel

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, BR, CA, CN, J
P, KR, NZ

(72)発明者 ジェンキンス, シャロン, エイ.
アメリカ合衆国, 01960 マサチューセッ
ツ, ビーボディ, ベケット ストリート
10

(72)発明者 ベイン, レンドン, ジー.
アメリカ合衆国, 02174 マサチューセッ
ツ, アーリントン, ヒルサイド アヴェニ
ュー 103

(72)発明者 ロバーツ, ブライアン, イー.
アメリカ合衆国, 02139 マサチューセッ
ツ, ケンブリッジ, ローレンス ストリー
ト 35